

**Der therapeutische Effekt von Dendriten und
Tumorzell-Fusions-Hybriden auf das Tumorwachstum der
akuten myeloischen Leukämie**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von

Swantje Klahr-Krick

Gießen 2014

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Abteilung Hämatologie und Onkologie

Leiter: Prof. Dr. Dr. F. Grimminger
Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. med. G.-Andre Banat, MBA
2. Gutachter: Prof. Dr. med. T. Acker

Tag der Disputation: 07.09.2017

Für Thorsten

Inhalt

1 Einleitung	1
1.1 Die akute myeloische Leukämie	1
1.2 Tumorimmunologie	5
1.3 Immuntherapie	10
2 Fragestellung	13
3 Materialien	14
3.1 Geräte	14
3.2 Verbrauchsmaterialien	15
3.3 Medien und Puffer	16
3.4 Zelllinien	17
3.5 Reagenzien, Zytokine und Antibiotika	18
3.6 Antikörper und Färbungen	19
3.7 Molekularbiologische Reagenzien	20
3.8 Primer	21
4 Methoden	22
4.1 Zellkulturarbeiten	22
4.2 Immunhistochemische Arbeiten	27
4.3 Durchflusszytometrie	28
4.4 Molekularbiologische Arbeiten	28
4.5 Funktionelle Zellkulturversuche	31
4.6 Statistik	37
5 Ergebnisse	38
5.1 Verifizierung der Fusionsrate	38
5.2 Proliferationsanalyse gesunder Spender-T-Zellen auf Stimulatorzellen	40
5.3 Proliferationsanalyse von Patienten-T-Zellen auf Stimulatorzellen	44
5.4 Heilungsversuch	47
6 Diskussion	69
6.1 Allgemeines	69
6.2 Die AML-Zelle	69
6.3 Immuntherapeutische Ansätze	70
6.4 Daten bestätigen eine erfolgreiche Fusion	74

6.5 Bestätigung der TZ-Aktivierung durch Hybride	74
6.6 Heilungsversuch	75
6.7 Fehlerquellen	78
6.8 Ausblick	78
7 Zusammenfassung	80
7.1 Summary	81
8 Statistik	82
8.1 Univariate Varianzanalyse	82
8.2 Paarweise Vergleiche	92
8.3 Univariate Tests	121
9 Abkürzungsverzeichnis	123
10 Abbildungsverzeichnis	126
11 Tabellenverzeichnis	128
12 Literaturverzeichnis	129
13 Eidesstattliche Erklärung	148
14 Ethik-Kommission	1
15 Danksagung	2
16 Lebenslauf	

1 Einleitung

In dieser Arbeit sind die Ergebnisse eines experimentellen Therapieansatzes der akuten myeloischen Leukämie (AML) dargestellt. Es wurden Hybride aus dendritischen Zellen (DZ) und Tumorzellen und hybrid-aktivierte T-Lymphozyten (T-Zellen) von Patienten mit einer inv(16)-positiven AML-Erkrankung und von Patienten mit einer inv(16)-negativen AML-Erkrankung untersucht.

1.1 Die akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie ist eine Erkrankung des hämatopoetischen Systems. Sie ist charakterisiert durch die diffuse und autonome Proliferation einer myeloischen Vorläuferzelle und die Ausschwemmung von unreifen, funktionsuntüchtigen Immunzellen, den Blasten, in das Blut. Durch die autonome Proliferation werden die gesunden Knochenmarkszellen verdrängt. Daraus resultieren eine Anämie, eine Neutropenie und eine Thrombopenie. Die ersten Symptome einer Anämie sind Leistungsabfall und Blässe. Durch die Thrombopenie und Neutropenie können schwere Blutungen und unbeherrschbare Infekte lebensbedrohenden Ausmaßes entstehen.

80% der akuten Leukämien im Erwachsenenalter sind akute myeloische Leukämien. Die jährliche weltweite Inzidenz liegt bei 3,4/100.000 (127). Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter. Der Gipfel liegt aufgrund der Altersstruktur in Deutschland um das 60. Lebensjahr (29, 106). Es sind unterschiedliche Risikofaktoren für die Entwicklung einer AML bekannt. So erhöhen Radioaktivität, bestimmte Chemikalien und Medikamente, eine familiäre genetische Belastung sowie ein erhöhtes Geburtsgewicht (59) das Risiko einer Erkrankung. Das Vorhandensein von Risikofaktoren bedingt nur einen kleinen Anteil der Erkrankungen. Der größere Anteil ist ätiologisch unbekannt.

In den letzten Jahren wurde durch intensive Forschung verdeutlicht, dass es sich bei der AML nicht um ein homogenes Krankheitsbild handelt. Dieses wird in unterschiedlichen Klassifikationen berücksichtigt.

1.1.1 Klassifikation

Zur Einteilung der AML sind zwei unterschiedliche Klassifikationen gebräuchlich. Basierend auf morphologischen und zytochemischen Kriterien unterscheidet die ältere French-American-British-(FAB)-Klassifikation sieben unterschiedliche Formen der AML, die mit typischen zytogenetischen Aberrationen assoziiert sind (12).

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML

M 1	Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung	-
M 2	Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung	t(8;21)
M 3	Akute Promyelozyten-Leukämie	t(15;17)
M 3 variant	Akute Promyelozyten-Leukämie, mikrogranuläre Form	t(15;17)
M 4	Akute myelomonozytäre Leukämie	-
M 4 Eo	Akute myelomonozytäre Leukämie mit Eosinophilie	inv(16)
M 5	akute Monozytenleukämie	-
M 5a	akute Monoblastenleukämie	-
M 5b	akute promonozytäre-monozytäre Leukämie	-
M 6	akute Erythroblastenleukämie	-
M 7	akute Megakaryoblastenleukämie	-

Tabelle 1: FAB-Klassifikation

Die neuere Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) berücksichtigt im Gegensatz zur FAB-Klassifikation neben morphologischen und zytochemischen Befunden auch die Zytogenetik der entarteten Zelle (44). Sie unterscheidet außerdem eine primäre „de novo“-AML von einer sekundären (z.B. aus einem myelodysplastischen Syndrom entstandenen) AML. Die WHO-Einteilung hat umso mehr Relevanz, als die Zytogenetik sowohl therapie-entscheidend als auch prognostisch aussagekräftig ist.

Die WHO unterscheidet folgende 4 Gruppen:

- AML mit rekurrierenden zytogenetischen Anomalien
- AML mit multilineärer Dysplasie (diese kann „de novo“ auftreten oder sich aus einem myelodysplastischen bzw. myeloproliferativen Syndrom entwickeln)
- AML Therapie-assoziiert (z.B. durch Alkylantien, Topoisomerase II-Inhibitoren)
- AML nicht anderweitig klassifizierbar

1.1.2 AML inv(16)

Klonale chromosomale Abnormitäten werden in 50 bis 60% der Fälle einer AML bei Erwachsenen gefunden (47). Die WHO beschreibt in der Untergruppe der AML mit rekurrierenden zytogenetischen Anomalien vier gut differenzierte genetische Aberrationen, die normalerweise mit einer „de novo“-AML assoziiert sind.

In 10 bis 12% der Fälle einer AML-Erkrankung und in nahezu allen Fällen einer AML M4 Eo tritt eine Translokation der homologen Chromosomen t(16; 16)(p13; q22) oder eine Inversion 16(p13; q22) auf (17). Durch diese Translokation kommt es zu einer Fusion des Core Binding Faktors beta (CBFbeta)-Gens auf Chromosom 16q13 mit dem smooth-muscle-myosin-heavy-chain (MYH) 11-Gen auf Chromosom 16q13.

CBFbeta ist ein Transkriptionsfaktor, der in die Regulation der Hämatopoese involviert ist. Abhängig von den Brechungsstellen und dem Rearrangement entstehen unterschiedliche genetische Sequenzen. Das Fusionsprotein blockiert die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen in die myeloide und lymphoide Zellreihe (21). Zudem scheint das Fusionsprotein eine molekulare Basis für die Expression von Leukämie-spezifischen Peptid-Sequenzen zu bilden, die eine T-Zell vermittelte Immunantwort gegen die Leukämiezellen induzieren könnten (17).

AML-Zellen können sowohl Major Histocompatibility Complex (MHC)-Protein Klasse-I- als auch Klasse-II Molekül assoziiert Antigene präsentieren. Es ist also möglich, durch AML-Zellen eine T-Zell Aktivierung und Antwort auszulösen. Sie präsentieren auch Liganden für den aktivierenden natürliche Killer Zellen (NKZ)-Rezeptor NKG2D. T-Zellen und NKZ führen durch unterschiedliche Wege zur Zytotoxizität der AML-Zellen. Sie können durch die Aktivierung des mit dem Tumor Nekrose Faktor (TNF)-verbundenen Apoptose-induzierenden Liganden (TRAIL) den Zelltod einleiten. Ebenfalls durch die Sekretion von Zytokinen wie TNF oder Interferon (IFN) können T-Zellen und NKZ zytotoxisch wirken (134).

Über zehn verschiedene CBFbeta MYH Transkriptionsprodukte wurden beschrieben, die als Tumorantigene wirksam sein könnten. Insgesamt haben Patienten mit einer inv(16)-positiven AML und qualitativ abnormen Eosinophilen eine weitaus bessere Prognose mit einem Gesamtüberleben von 54% nach 5 Jahren und 34% Gesamtüberleben nach einem Rezidiv als Patienten mit anderen genetischen Abnormitäten (64, 4).

1.1.3 Therapie und Prognose

Die Grundlage der Therapie einer AML bildet eine intensive Chemotherapie. Die Therapie beginnt mit einer Induktionsphase, deren Ziel eine komplette Remission ($<5\%$ Blasten im Blut oder Knochenmark) ist. Das Standardregime besteht aus Cytarabin in Kombination mit einem Anthrazyclin.

Durch die Induktionstherapie kann bei 50-75% der erwachsenen Patienten eine komplette Remission erzielt werden (116). Ein Alter von über 65 Jahren ist mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert (98). Bei diesen Patienten wird nur in 45-55% eine komplette Remission erzielt. Trotz der erreichten Remission übersteht bei 80% der Patienten eine kleine Anzahl von Leukämiezellen die Therapie.

Dieses Phänomen wird Minimal-Residual-Disease (MRD) genannt. Eine MRD ist mit einem erhöhten Rezidiv-Risiko assoziiert und somit die Haupttodesursache der AML. Bei 60% der Patienten mit einer MRD rezidiert die AML innerhalb der ersten zwei Jahre. Durch die Konsolidierungsphase soll mittels Elimination der MRD eine Verbesserung des Therapieerfolges erzielt werden. Trotz der in vielen Fällen bereits nach der Induktionstherapie erreichten Remission ist die Prognose einer AML schlecht, die 5-Jahres-Überlebensrate aller AML-Patienten liegt zwischen 20-40% (116).

Eine weitere Intensivierung der Konsolidierungstherapie kann durch eine autologe oder allogene Knochenmarks-/Stammzelltransplantation erfolgen. Der Vorteil einer autologen Transplantation liegt in der Verfügbarkeit und der Verträglichkeit. Die allogene Stammzelltransplantation während der ersten Remission ist die Therapie mit den niedrigsten Rezidiv-Raten. Diese Therapieform der AML hat das höchste antileukämische Potential, da die Immunzellen des Spenders die restlichen Knochenmarkszellen des Empfängers im Knochenmark als fremd erkennen und eine immunologische Reaktion auslösen. Dieser „Graft-versus-Leukaemia (GvL)-Effekt“ findet bei der autologen Transplantation nicht statt. Die allogene Transplantation ist aber auch mit einer wesentlich höheren therapieassoziierten Morbidität verbunden als die Chemotherapie oder eine autologe Transplantation, so dass die Entscheidung für eine Transplantation patientenabhängig gefällt werden muss (66). Außerdem ist eine allogene Transplantation durch die begrenzte Anzahl an Spendern nur für wenige Patienten verfügbar.

Sowohl die Chemotherapie als auch die Transplantation sind mit schweren Einschränkungen für den Patienten verbunden. Als Therapie sind sie nicht für jeden

geeignet und in vielen Fällen auch nicht ausreichend. So tolerieren Patienten von über 55 Jahren wegen häufiger Komorbiditäten eine intensive Chemotherapie schlechter. Außerdem werden in dieser Patientengruppe gehäuft Karyotypen der AML-Zellen gefunden, die mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind. P-glycoprotein, ein Marker für multiple Medikamenten-Resistenzen, wird in dieser Patientengruppe vermehrt gefunden (53, 63). Diese Problematik führte dazu, dass die Immunologie als unterstützender Therapiearm, insbesondere zur Therapie der MRD, in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung rückte.

1.2 Tumorimmunologie

Bereits 1970 hatte Burnet die Vorstellung, dass das Immunsystem Tumorzellen aufspüren und sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort auslösen kann, die den Tumor in seiner Entstehung behindert (33, 20). Diese Theorie, Immunüberwachung oder Immuno-Surveillance genannt, wird durch unterschiedliche Beobachtungen gestärkt. Mäuse, die aufgrund genetischer Veränderungen eine Schwäche der zellulären Immunität aufweisen, haben ein signifikant höheres Risiko, spontan einen Tumor zu entwickeln (104). Die Inzidenz von nicht viral bedingten Tumoren ist auch bei immuninkompetenten Menschen (z.B. aufgrund einer Erkrankung durch das humane Immundefizienz-Virus (HIV)) signifikant höher als bei immunkompetenten (16). Außerdem weisen Patienten mit einer prä-malignen Erkrankung oder mit frühen Stadien einer Tumorerkrankung ein breites Spektrum von Immunantworten auf.

So entwickeln Patienten mit einer monoklonalen Gammopathie z.B. eine starke T-Zell-Antwort gegen die prä-malignen B-Lymphozyten (BZ) (30). Das Knochenmark von Brustkrebspatientinnen weist in frühen Stadien der Erkrankung CD8-positive T-Zellen auf, die spezifisch gegen Bestandteile des Human-epidermal-growth-receptor 2 (HER2/NEU) gerichtet sind. HER2/NEU ist ein Rezeptor, der von Tumorzellen von Brustkrebspatientinnen überexprimiert wird. Die T-Zellen sind in der Lage, einen autologen humanen Brustkrebstumor, transplantiert in eine immuninkompetente Maus, abzutöten (10). Ebenfalls ist die Anzahl der den Tumor infiltrierenden Lymphozyten (TIL) ein prognostischer Marker für solide Tumore (140). Der Beweis der Immunüberwachung im Rahmen der AML kann indirekt geführt werden. So kann die Anzahl von Lymphozyten sechs Wochen nach Chemotherapie bei der AML als

prognostischer Faktor genutzt werden. Patienten mit der höchsten Anzahl von Lymphozyten zu diesem Zeitpunkt zeigen eine signifikant niedrigere Rezidiv-Rate (26, 9).

Die Theorie der Immuno-Surveillance setzt das Vorhandensein von spezifischen Tumor-assoziierten Antigenen (TAA) voraus. Ein Beweis für die Existenz von Tumorantigenen wurde in Studien von Prehn erbracht. Er zeigte, dass Mäuse, die zuvor mit einem inaktivierten autologen Tumor an geimpft wurden, in der Lage sind, aktive Tumorzellen zu unterdrücken. Ungeimpfte Mäuse besaßen diese Fähigkeit nicht (86). Über 1000 menschliche Tumorantigene wurden mittlerweile entdeckt (89).

1.2.1 Tumorantigene

Die Basis immunologischer Therapiemöglichkeiten wird von Tumorantigenen gebildet. Diese werden in fünf Klassen eingeteilt, die zwei Gruppen zugeordnet werden können (114).

Spezifische Tumorantigene werden nur von maligne veränderten Zellen präsentiert und nicht in gesundem Gewebe gefunden. Sie bilden den idealen Ausgangspunkt für eine Immuntherapie, da das Repertoire an immunologischen Reaktionsmöglichkeiten nicht durch Selbsttoleranz begrenzt wird. „Shared“ Antigene werden sowohl von tumorösen Zellen als auch von gesundem Gewebe präsentiert.

Die spezifischen Tumorantigene werden in drei Klassen unterteilt.

- Patientenspezifische Tumorantigene sind individuell für einen bestimmten Tumor bei einem bestimmten Patienten. Sie sind durch genetische Aberration entstanden und unterscheiden sich von den Antigenen gesunder Zellen und anderer Tumore.
- Tumorspezifische Antigene werden von einer bestimmten Tumor-Art auch in unterschiedlichen Patienten exprimiert. Virale Antigene werden dieser Gruppe zugeordnet. Das Onkoprotein E7 des humanen Papilloma (HP)-Virus wird von Tumorzellen des Cervixkarzinoms exprimiert. Das latente-Membran-Protein-1 (LMP1) des Epstein-Barr (EB)-Virus findet sich auf Zellen des nasopharyngealen Karzinoms und im Burkitt Lymphom (55). Auch Antigene, die durch Mutation von Onkogenen entstehen, wie die Cyclin-abhängige-Kinase-4 (CDK-4), werden dieser Gruppe zugerechnet (135, 91). In einer Studie, bei der das Serum von chronischen myeloischen Leukämie (CML)

Patienten nach Transfusion von Spender-Lymphozyten untersucht wurde, fanden sich sehr spezifische Antikörper (AK) gegen die Antigene Ras-related Protein (RAB38), tubulin-spezifisches Chaperon E (TBCE), und dual spezifizierte Protein-Phosphatase 12 (DUSP12). Diese Antikörper fanden sich weder bei gesunden Probanden noch bei Patienten, die an einer anderen Leukämieform erkrankt waren. Es ist also davon auszugehen, dass es sich um sehr spezifische Tumor-assoziierte Antigene handelt (11).

- „Cancer testis Antigene“ werden nicht nur von entarteten Zellen exprimiert, sondern auch von embryonalen Zellen, wie den Zellen des Hodens oder der Plazenta. Zu dieser Gruppe gehören die Proteine der Mage-, Gage-, Bage - Familie (11). Da die embryonalen Zellen keine MHC-I Moleküle exprimieren (126, 27), ist diese Art von Tumorantigenen für das Immunsystem strikt Tumorspezifisch (115).

Die „shared“ Antigene werden vermehrt in Tumorzellen gefunden. Sie werden aber auch von gesunden Zellen zusammen mit MHC-Molekülen exprimiert und sind deshalb nicht spezifisch. Eine Immuntherapie gegen diese Antigene beinhaltet die Schwierigkeit, immunologische Toleranz zu durchbrechen, ohne autoimmunologische Reaktionen gegen gesundes Gewebe auszulösen. Zu ihnen gehören folgende Klassen:

- Gewebsspezifische Differenzierungsantigene, wie etwa das Carcinom-embryonale-Antigen (CEA), ein onkofetales Protein, das sowohl von normalem Kolonepithel als auch von Darmtumoren exprimiert wird. Das CEA enthält bestimmte Epitope, die von T-Zellen CEA-immunisierter Patienten erkannt werden (125). Weitere Antigene dieser Klasse sind Tyrosinase related Protein (TRP), gp75, gp100 oder Melan A/ Mart1, die bei Melanom-Patienten beschrieben sind.
- Proteine, die in Tumoren überexprimiert vorliegen, gleichzeitig jedoch auch in gesundem Gewebe zu finden sind, wie z.B. HER-2/NEU oder das Tumorsuppressorprotein p53 (78).

Durch effektive Immunantworten können maligne entartete Zellen eliminiert werden. Gelingt es dem Tumor trotz der Immunüberwachung zu wachsen, beginnt die nächste Stufe der Tumorgenese mit einem Äquilibrium zwischen dem Immunsystem und dem

Tumor. Das Immunsystem eliminiert immunogene Tumorzellen. Das führt dazu, dass die weniger immunogenen Zellen einen Selektionsvorteil haben. Der Tumor beginnt mit der Entwicklung von Escape-Mechanismen (78).

1.2.2 Escape-Mechanismen

Mit Escape-Mechanismen werden Strategien des Tumors bezeichnet, die zu einer Abnahme der Immunantwort führen. Die Hypothese der Immun-escape-Strategien wird durch unterschiedliche Beobachtungen untermauert. Im Rahmen von Mausexperimenten konnte dargestellt werden, dass Tumore, die in einer immunsupprimierten Umgebung entstanden sind, weitaus immunogener sind als solche, die in immunkompetenter Umgebung entstehen (32, 139).

Eine effektive Immunantwort benötigt sowohl die Antigen-Präsentation durch MHC Klasse-I- als auch durch MHC Klasse-II Moleküle (69). Zwischen 39% und 88% der Tumore zeigen eine Abnahme oder Veränderungen der humanen Leukozyten Antigene (HLA)-I Moleküle. Die Down- Regulation von MHC-I Molekülen führt zu einer persistierenden Antigenpräsentation, ohne eine effektive CD8-positive T-Zell-Antwort auszulösen, da die passenden kostimulatorischen Signale fehlen. Die Folge kann der Verlust einer im Prinzip hochspezifischen T-Zell-Antwort sein oder eine T-Zell-Toleranz (38). Veränderungen oder die Abnahme der HLA-II Moleküle führen zu Störungen in der Aktivierung von CD4-positiven T-Zellen.

Nach allogener Stammzelltransplantation konnte nachgewiesen werden, dass die Blasten der AML in der Lage sind, die HLA-Antigene, die nicht mit denen des Spenders identisch sind, herunterzuregeln. So kann ein starker „Graft-versus-Leukaemia-Effekt (GvL)“ verhindert werden (128).

Ein weiterer Mechanismus, der in mangelhafter T-Zell-Aktivierung resultiert, ist bei dendritischen Zellen beschrieben. Über bisher unbekannte Mechanismen können Tumorzellen die Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO) Expression in DZ modulieren. Das führt zur Unfähigkeit der DZ, Lymphozyten zu aktivieren (75). Bei Tumorzellen eines Nierenkarzinoms wurde beobachtet, dass Tumorzellen in der Lage sind, die T-Zell-Antwort durch die Überexpression des Proteins human B7 homolog 1 (B7-H1) zu inhibieren (119).

Der Verlust von Antigenen der Zelloberfläche zeigt, wie effektiv der Tumor Immunabwehrstrategien ausnutzen kann. Antigene werden durch Antikörper zu Aggregaten vernetzt. Diese werden an einem Zellpol gesammelt und entweder durch Endozytose in das Zellinnere aufgenommen oder abgestoßen (105).

In Immunisierungsversuchen mit Tumorantigenen konnte gezeigt werden, dass der Verlust eines Tumorantigens einen Selektionsvorteil für die Tumorzelle darstellt. In diesen Versuchen wurden Melanom-Patienten immunisiert, die bereits Metastasen gebildet hatten, entweder mit Melan-A /Mart-1-Peptid oder mit Tyrosinase-Peptiden. Die Regression der Metastasen korrelierte mit der Persistenz der Antigene. Bei Patienten, die ein Fortschreiten der Erkrankung zeigten, waren die Tumorantigene nicht mehr nachweisbar (51). Tumorzellen sind auch in der Lage, durch die Sekretion von Zytokinen eine immunsupprimierende Umgebung zu schaffen. Schilddrüsentumore produzieren Interleukin (IL)-4 und IL-10 als autokrine Wachstumsstimulatoren. Diese Zytokine wandeln eine immunologische T-Helferzelle-1 (TH-1)-Antwort in eine TH-2-Antwort um. Somit unterdrücken sie die immunologische Reaktion gegen den Tumor, die auf der Seite der TH1-Zellen liegt (111, 133).

IL-2 führt in niedriger Dosis kombiniert mit Histamin-Dihydrochlorid zu einer verstärkten NKZ-Antwort durch die Konservierung der aktivierenden Rezeptoren NKG2D und NKp46 (92). AML-Zellen präsentieren unterschiedlich ausgeprägt MHC-Klasse-II assoziierte unveränderliche Selbst-Peptide. Die Down-Regulation dieser Peptide verhindert die Beladung der MHC-Klasse-II Moleküle und mindert eine starke CD4-positive T-Zell- Antwort (129).

Eines der wichtigsten antiproliferativen Signale wird durch den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF)- β vermittelt (81, 48). Mutationen oder der Verlust des Rezeptors durch die Tumorzelle führen zum ungehemmten Wachstum des Tumors. Zusätzlich ist TGF β eines der potentesten immunsuppressiven Agenzien, das die zytotoxische Aktivität von NKZ supprimiert (42).

Die Expression von NKZ-Liganden durch AML-Zellen wie z.B. MHC-I Molekülen und CD44 bestimmt die Möglichkeit der Zytotoxizität von NKZ. Eine hohe Expression von HLA-G, HLA-Bw4 und HLA-C schützt AML-Zellen vor der Lyse durch NKZ und ist assoziiert mit einem schlechteren Outcome nach Chemotherapie (130, 136).

Schlussendlich können einige Tumorzellen aktiv die Apoptose von Immunzellen einleiten. Ein Oberflächenrezeptor von Lymphozyten, über den Apoptose-Signale

vermittelt werden, ist Fas(CD95/APO-1). Dieser Rezeptor hat normalerweise eine immunregulatorische Funktion. Über ihn werden die Beendigung der Immunantwort und eine Toleranzentwicklung in Organen vermittelt. Der Ligand für den Fas-Rezeptor ist FasL. Kolon-Tumore sind in der Lage, durch die Expression von FasL die Apoptose von Lymphozyten einzuleiten (60).

1.3 Immuntherapie

Die gängigen therapeutischen Strategien gegen eine maligne Grunderkrankung stellen eine große Belastung für den Patienten dar. Insbesondere die allogene Transplantation ist auch nicht für jeden verfügbar. Im Kampf gegen Krebs rücken in den letzten Jahren die immunologischen Verfahren immer mehr in den Mittelpunkt der Forschung. Um das Immunsystem im Kampf gegen bösartige Zellen einzusetzen, wurden unterschiedliche therapeutische Strategien entwickelt. Eine passive Immuntherapie wird von einer aktiven unterschieden. Als passive Immuntherapie wird die in vitro-Generierung von Effektorzellen und Molekülen, die nach in vivo-Transferierung hoch spezifisch die Tumorzellen erkennen und diese töten können (106), bezeichnet. Im Rahmen der aktiven Immuntherapie wird das Immunsystem in vivo stimuliert, eine zelluläre Immunantwort gegen die Krebszelle zu bilden. Zu den passiven Mechanismen zählen die Therapie mit Antikörpern, der Transfer von „ex vivo“-aktivierten Lymphozyten und die Gabe von Immunmodulatoren wie z.B. Zytokine. Zur aktiven Immuntherapie wurden unterschiedliche Vakzinierungsstrategien entwickelt.

1.3.1 Antikörpertherapie

Das Ziel einer Therapie mit Antikörpern liegt darin, Rezeptoren von Wachstumsfaktoren zu blockieren, NK-Zellen Zytotoxizität zu vermitteln und in Verbindung mit Chemotherapeutika, radioaktivem Material und sonstigen Toxinen den Tumor besser erreichen zu können (89). Antikörper können sich auch direkt gegen Tumorantigene richten. Etablierte Therapieformen sind die Gabe von Antikörpern gegen den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) bei metastasiertem Kolonkarzinom (Erbix[®]), von Antikörpern gegen CD20 bei B-Zell Lymphomen und die Gabe von Antikörpern gegen das HER2/Neu Antigen bei Brustkrebs (102).

1.3.2 Transfer von „ex vivo“-aktivierten Lymphozyten

Bisher handelte es sich beim adoptiven Transfer von gegenüber dem Tumor geprimten T-Zellen entweder um so genannte Lymphokin-aktivierte-(LAK)-T-Lymphozyten oder um TIL. LAK werden aus dem Blut gewonnen, TIL durch Biopsien. In unterschiedlichen Versuchen an Melanom-Patienten wurden diese Lymphozyten in vitro mit hohen Konzentrationen IL-2 kultiviert. Die Lymphozyten proliferierten und griffen die Tumorzelle an (123). Mit dem adoptiven Transfer von in vitro kultivierten T-Zell-Klonen mit spezifischer Aktivität gegen MHC restringierte Antigene von AML-Zellen konnte in einigen Fällen eine komplette Remission erzielt werden (69).

1.3.3 Zytokine

Die Entdeckung, dass IL-2 als Wachstumsfaktor für T-Zellen dient, führte zu weiteren Experimenten. Die Beobachtung, dass die direkte Gabe von IL-2 in Mäusen zu einer Tumorregression von Lungenkarzinomen führt (93), gab den Anstoß, die Auswirkungen einer IL-2-Gabe bei humanen Tumoren zu untersuchen. So konnte durch die alleinige Gabe hoher Dosen IL-2 eine Regression bei Nierenkarzinompatienten beobachtet werden (95). IL-2 hat aber keinen direkten Effekt auf Tumorzellen. Diese können in vitro auch bei hohen Konzentrationen von IL-2 wachsen. IL-2 ist in vivo vielmehr dafür verantwortlich, dass das Immunsystem die Tumorzelle angreifen kann.

1.3.4 Vakzinierungsstrategien

P. Moingeon schreibt in seinem Review, dass ca. 16% der weltweiten Krebserkrankungen infektiösen Ursprungs sind und fordert als logische Konsequenz als primäre Prävention eine Vakzinierung gegen diese Infektionen (73). Zurzeit sind zwei Impfungen gegen viral verursachte Tumore verfügbar. Durch die Vakzinierung gegen das Hepatitis B-Virus (HBV) konnte die Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms signifikant gesenkt werden (54). Die Impfung gegen humane Papillomviren verspricht großen Erfolg im Kampf gegen das Zervixkarzinom (68).

Vakzinierungsstrategien, die als sekundäre Prävention gegen bereits bestehende Tumorzellen gerichtet sind, lassen sich in zwei Bereiche aufteilen. Es wird hier der Einsatz von einzelnen Peptiden von Vakzinierungen unterschieden, bei denen die ganze Tumorzelle zum Einsatz kommt.

Das Ziel einer Immunisierung mit Peptiden, die Epitope von Tumor-assoziierten

Antigenen präsentieren, ist die Aktivierung einer hoch spezifischen T-Zell-Antwort.

Im Gegensatz zur Vakzinierung mit einzelnen Peptiden werden durch den Einsatz von ganzen Tumorzellen theoretisch auch unbekannte Tumor-assoziierte Antigene präsentiert. Auch wenn AML-Zellen in vitro T-Zellen aktivieren, sind Vakzinierungen mit unveränderten AML-Zellen aufgrund der ausgeprägten Escape-Strategien der Blasten nur wenig wirksam. Aufgrund dessen wurden unterschiedliche Strategien zur Verstärkung der Immunantwort sowie zur Verbesserung der Antigenpräsentation entwickelt. Um die Problematik der unzureichenden Antigenpräsentation zu lösen, nutzt man die Fähigkeit professioneller Antigen präsentierender Zellen (APZ), vor allem die der dendritischen Zellen. Unterschiedliche Strategien wurden entwickelt, um tumorspezifische Antigene in DZ zu schleusen mit dem Ziel, T-Zellen und ZTL zu generieren, die sich gegen den Tumor richten.

Zurzeit werden mehrere Möglichkeiten, die DZ mit Tumorantigenen zu beladen, untersucht, beispielsweise die in vitro-Beladung mit Tumorantigenen in Form von intakten Proteinen (22, 14).

Weitere Möglichkeiten sind die Beladung der DZ mit Tumorlysaten, synthetischen Peptiden oder apoptotischen Zellfragmenten (76, 70). Die genannten Möglichkeiten führen dazu, dass theoretisch nur ein Teil der potentiellen Tumorantigene einer Zelle von der DZ präsentiert wird. DZ-Tumor-Zellfusionen stellen diesbezüglich die optimale Methode da. Durch die Fusion werden von den HZ sowohl multiple Tumorantigene MHC-I und MHC-II assoziiert präsentiert, als auch kostimulatorische Moleküle der DZ. Auf diese Weise können alle Arme der zellulären Immunität aktiviert werden (58).

Präklinische Studien in unserem Labor haben gezeigt, dass Hybridvakzinierungen effektiv eine Immunantwort auch gegen solche Tumore auslösen können, die nur wenig immunogen wirksam sind. Es wurden DZ mit Tumorzellen des wenig immunogenen Lewis-lung-carcinoms (LLC) fusioniert. Die Immunisierung von Mäusen mit diesen Hybridzellen (HZ) induzierte die Expression einer Vielzahl von Zytokinen und führte in Teilen zu einer protektiven Immunität gegen eine LLC Tumor Challenge. Außerdem resultierte eine Hybridvakzinierung zusammen mit einer adoptiven Immuntherapie in einer signifikanten Tumorregression (97, 99). Auch bei klinischen Studien, die Fusionsprodukte aus DZ und Tumorzellen von Ovarial-, Brustkrebs- oder Melanom-Patienten enthielten, konnte ein viel versprechendes Ergebnis in Form einer starken ZTL-Aktivität gegen autologe Tumorzellen erzielt werden (56, 41).

2 Fragestellung

Die inv(16)-positive AML-Zelle als Zelle einer häufigen hämatologischen Tumorerkrankung im Erwachsenenalter, mit besserer Prognose als inv(16)-negative Erkrankungen, ist Inhalt unserer Studien (74, 72, 19).

In präklinischen Studien unseres Labors konnten Hinweise auf eine Immunogenität der AML inv(16)-Zelle aufgezeigt werden (7). Die Besonderheiten der AML inv(16)-Zelle, die Fusion der AML-Tumorzelle mit dendritischen Zellen sowie die Entwicklung eines Hybridvakzins stehen im Zentrum unserer Untersuchungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Führt die Fusion einer AML-Tumorzelle mit dendritischen Zellen zu einem stabilen Fusionsprodukt?
2. Ist das Fusionsprodukt einer AML- und einer dendritischen Zelle fähig, Antigene effektiv zu präsentieren und damit eine T-Zell-Antwort zu induzieren?
3. Inwieweit ist es möglich, durch die Vakzinierung mit Fusionszellen aus autologen DZ und inv(16)-positiven AML-Zellen eine lang anhaltende Immunität gegenüber den Leukämiezellen in vivo hervorzurufen sowie die Proliferation von stimulierten T-Lymphozyten sowohl in vivo, als auch in vitro zu induzieren?

3 Materialien

3.1 Geräte

Produkt:	Hersteller:
Bench	Heraeus Instruments, USA
Bestrahlungsgerät	OB 29; STS, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Instruments, USA
Durchflusszytometer	Beckmann und Coulter, Deutschland
Elektroporationsgerät	Bio Rad, Hercules, USA
Fluoreszenzmikroskop	Leica Instruments, Deutschland
Horizontale Flachbrett- Gelelektrophoreseapparatur	KEUTZ Labortechnik
Lichtmikroskop	Leica Instruments, Deutschland
Mikrozentrifuge	Heraeus, Deutschland
Multipette® plus	Eppendorf
Eppendorf Pipetten	Eppendorf Deutschland
Pipettboy acu	IBS Integra Biosciences
Thermocycler	Perkin Elmer 2400, Deutschland
UV-Transilluminator	Biometra System, Deutschland
Vortex	Heidolph, Deutschland
Wasserbad	GFL®
Zentrifuge	Heraeus Instruments, USA
Zytozentrifuge	Thermo- Cytospinn, USA

Tabelle 2: Geräte

3.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Butterfly 21G grün	Kabe Labortechnik
Combitips	Eppendorf, Deutschland
Combi-Stopper	Braun
Elektroporationscuvette	Biozym Diagnostik GmbH, Deutschland
Eppendorf Pipettenaufsätze	Eppendorf, Deutschland
Heparin Kanülen	Becton Dickinson GmbH Deutschland
Heparin Spritze	Braun Melsungen AG, Deutschland
Messröhrchen für Durchflusszytometer	Sarstedt, Deutschland
Pipetten für Pipettboy	Falcon, Becton Dickinson, GmbH Deutschland
Rundboden und V-Form-Zellkulturplatten, 25 und 96 Well	Greiner Bio-One, Deutschland
Tubes, 15 und 50ml	Greiner Bio-One, Deutschland
Zellkulturflaschen 10, 20 und 50ml	Greiner Bio-One, Deutschland

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

3.3 Medien und Puffer

Verwendung:	Zusammenstellung:
Einfriermedium	RPMI-1640 Medium (PAN Biotech GmbH, Deutschland) unter Zusatz von 20% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma, Deutschland)
Färbepuffer für die Durchflusszytometrie	PBS (PAA Laboratories GmbH Österreich) Saline Lösung mit 0,2% BSA
Medium für die Zellkultur von AML-Zellen, Dendriten und Hybridzellen für im Rahmen des Heilungsversuches	RPMI-1640 Medium (PAN Biotech GmbH, Deutschland) ohne weitere Zusätze
Medium für die Zellkultur von Tumorzelllinien, Hybridzellen, Lymphozyten und Dendriten	RPMI-1640 Medium (PAN Biotech GmbH, Deutschland) unter Zusatz von 2% fetalem Kälberserum (FCS) (Greiner bio one, Deutschland), Penicillin (100U/ml) und Streptomycin (0.1 mg/ml) (Gibco, Deutschland)
Puffer	PBS (PAA Laboratories GmbH Österreich) Saline Lösung, PH 7,4 ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺
Puffer zur Lyse von störenden Erythrozyten	„BD Pharm Lyse“ Pufferlösung mit destilliertem Wasser im Verhältnis von 1:10 verdünnt
Waschmedium	RPMI-1640 Medium (PAN Biotech GmbH, Deutschland) unter Zusatz von 5% FCS
Waschpuffer für die Durchflusszytometrie	PBS (PAA Laboratories GmbH Österreich) Saline Lösung unter Zusatz von 5% BSA

Tabelle 4: Medien und Puffer

3.4 Zelllinien

Zellart:	Hersteller
Spenderzellen	Es wurden TZ und PBMCs von 4 gesunden Spendern der Haplotypen HLA-A1,-A2,-A3 eingesetzt
Patientenzellen	Es wurden AML-Zellen, TZ und PBMCs von inv(16)-positiven sowie inv(16)-negativen Patienten unterschiedlicher Haplotypen eingesetzt
Standartzellen: K562	Zellen einer humanen chronischen Leukämie während der Blastenkrise. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)

Tabelle 5: Zelllinien

3.5 Reagenzien, Zytokine und Antibiotika

Produkt	Hersteller
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
BD Pharm Lyse	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
FCS	PAA, Austria
Ficoll-Paque Plus	Amersham Biosciences, Schweden
GM-CSF	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Deutschland
Heparin	Ratiopharm, Deutschland
IL-2	Becton Dickinson GmbH, Deutschland
IL-4	Strathmann Biotech AG, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Gibco Invitrogen GmbH, Deutschland
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
T Cell Negative TM Isolation Kit	Dynal [®]
TNF- α	BD Pharmingen, Deutschland
Trypanblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Deutschland

Tabelle 6: Reagenzien, Zytokine und Antibiotika

3.6 Antikörper und Färbungen

Produkt:	Hersteller:	Aufgabe:
Propidiumjodid	Beckmann Coulter GmbH, Deutschland	Anfärbung von toten Zellen
IgG2b	Becton Dickinson GmbH, Deutschland	Bindungsantikörper für ein Panning
B7-1 PE (CD80)	Becton Dickinson GmbH, Deutschland	Kostimulatorisches Molekül auf dendritischen Zellen
CD13/33 PE	Becton Dickinson GmbH, Deutschland	Marker für myeloische Leukämie zur Färbung der Standardzellen.
PKH-26	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland	Rot fluoreszierender Zellmembranmarker
PKH-67	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland	Grün fluoreszierender Zellmembranmarker
HLA DR	Pharmingen, Germany	Marker für AML-Blasten
CD2-FITC	Pharmingen, Germany	Marker für AML-Blasten
CD3-FITC	PharMingen, USA	Marker für TZ
CD4-FITC	Pharmingen, Germany	Marker für CD4(+) TZ
CD7-FITC	Pharmingen, Germany	Marker für AML-Blasten
CD8-FITC	Pharmingen, Germany	Marker für CD8(+) TZ
CD13-FITC	Pharmingen, Germany	Marker für AML-Blasten
CD14-FITC	Pharmingen, Germany	Marker für AML-Blasten
CD34-FITC	Pharmingen, Germany	Marker für AML-Blasten
CD41a-FITC	Pharmingen, Germany	Marker für AML-Blasten
CD80-FITC	Pharmingen, Germany	Marker für Monozyten
DC Sign/CD83-PE	Pharmingen, Germany	Marker für die Reifung DZ
DC Sign (CD209)-PE	Pharmingen, Germany	Marker für DZ

Tabelle 7: Antikörper und Färbungen

3.7 Molekularbiologische Reagenzien

Produkt	Hersteller
QI AmpDNA Mini Kit	QIAGEN, Deutschland
RNeasy Mini-Kit	QIAGEN, Deutschland
ImProm-II™ Reverse Transcription System mit oligo (dT) ₁₂₋₁₈ Primern	Promega Corporation, USA
Biotin-16-dNTP	Roche, Deutschland
CD3(+) T-Zell Negativ- Isolationskit	Miltenyibiotec, USA
HLA SSP Kits	Biotest, Deutschland
Agarose	Invitrogen, Deutschland
1kb DNA Ladder	Invitrogen, Deutschland
10kb DNA Ladder	Invitrogen, Deutschland

Tabelle 8: Molekularbiologische Reagenzien

Zusammensetzung PCR- Reagenz für die HLA-Typisierung

PCR- Cocktail Cock	120,0µl
Tag DNA Polymerase (5U/µl)	1,8µl
dH ₂ O	150,0µl
Endvolumen	271,8µl

Nested PCR I Reagenz für die Nested PCR

Nukleasefreies Wasser	11,0µl
10x-Invitrogen Super Mix-Puffer (Invitrogen, Deutschland)	2,0µl
GeneAmp dntp (Applied Biosystems)	1,6µl
MgCl ₂ , 50mM (Invitrogen, Deutschland)	0,6µl
MYH11 ex down 1 (MWG-Biotech AG)	0,8µl
CBFbeta µp3 (MWG-Biotech AG)	0,8µl
<u>Tag Polymerase (Invitrogen, Deutschland)</u>	<u>0,2µl</u>
PCR-Endvolumen	50,0µl

Nested PCR II Reagenz

Nukleasefreies Wasser	13,8µl
10x-Invitrogen Super Mix-Puffer (Invitrogen, Deutschland)	2,0µl
GeneAmp dntp (Applied Biosystems)	1,6µl
MgCl ₂ , 50mM (Invitrogen, Deutschland)	0,6µl
MYH11 int down 1(MWG-Biotech AG)	0,4µl
CBFbeta µp3 (MWG-Biotech AG)	0,4µl
<u>Tag Polymerase (Invitrogen, Deutschland)</u>	<u>0,2µl</u>
PCR-Endvolumen	50,0µl

cDNA Mastermix

dntp (Applied Biosystem)	1,0µl
Reverse Transkriptase (Invitrogen, Deutschland)	1,0µl
Random Primer (1:3) (Boehringer)	1,5µl
R-Nasin (Promega)	0,5µl
5xPuffer (Invitrogen, Deutschland)	5,0µl
DTT (Invitrogen, Deutschland)	2,5µ

3.8 Primer

Gen	Bestell Nr.	Primer	Größe
MYH11 ex down 1	MWG Biotech AG, Deutschland	5'- TTC CGT CTC ATA CTC GTG AAG CTG- 3'	24
MYH11 int down 2	MWG Biotech AG, Deutschland	5'- TCT CCT CAT TCT GCT CGT CCC GG-3'	23
CBFβ up 3	MWG Biotech AG, Deutschland	5'- CAG GCA AGG TAT ATT TGA AGG-3'	21

Tabelle 9: Primer

4 Methoden

Nach Genehmigung durch die lokale Ethikkommission (Zeichen: 103/01; Sitzung am 07.12.2000) wurde die Studie in der medizinischen Klinik IV der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Das methodische Vorgehen wird in den folgenden Abschnitten dargestellt.

4.1 Zellkulturarbeiten

4.1.1 Isolation von Tumorzellen

Die Knochenmarkszellen wurden mittels Knochenmarksaspiration aus dem hinteren Beckenkamm gewonnen. Durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 Minuten bildeten die Zellen ein Pellet. Das abpipettierte Plasma wurde für andere Forschungsvorhaben in unserem Labor bei -20 °C eingefroren.

Um störende Erythrozyten zu eliminieren, wurde durch mehrmalige Zugabe von Erylyse, Zentrifugation und Absaugen des Überstandes eine Erythrozyten freie Zellsuspension erlangt. Der Anteil der Blasten wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper (CD11c, CD13, CD14, CD34, CD45, CD68, und HLA DR) anhand der typischen immunophenotypischen Charakteristika bestimmt und betrug > 95%. Die Erythrozyten freie Zellsuspension wurde entweder in einer Kühlkette von einer Stunde bei -20 °C, 24 Stunden bei -80 °C und anschließend -120 °C unter Zugabe von Gefriermedium tiefgefroren, oder die Zellen wurden in Portionen von 10×10^6 Blasten in 18 ml RPMI-1640-Kulturmedium mit einem Zusatz von 10% filtriertem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (PS) aufgenommen. Bei den Blasten, die im Rahmen des Heilungsversuches verwendet wurden, ersetzen wir das filtrierte Kälberserum durch autologes Serum der betroffenen Patientin.

Die weitere Verarbeitung erfolgte nach dem zweiten Generationswechsel der AML-Zellen.

4.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Portionen von $20\text{-}50 \times 10^6$ Zellen wurden in einem Volumen von 500 μl Einfriermedium mit einer Temperatur von -20°C aufgenommen. Die Zellsuspension lagerte für eine Stunde bei -20°C , anschließend für 24 Stunden bei -80°C . Danach erfolgte die Lagerung bis zur weiteren Verwendung bei -120°C . Das Auftauen erfolgte zügig mittels Schwenken in 37°C warmen Wasser. Nach dem Auftauen erfolgte die sofortige Zentrifugation sowie erneutes Waschen in RPMI-Kulturmedium mit 5% FCS, um die zellschädigenden Kristalle des Einfriermediums vollständig zu entfernen. Im Anschluss erfolgte durch einen Ficoll-Dichtegradienten die Trennung apoptotischer Zellen von lebenden.

4.1.3 Isolieren von mononukleären Zellen

Die Isolierung von mononukleären Zellen erfolgte entweder aus heparinisiertem Vollblut oder aus Knochenmarksaspirat mit Hilfe eines Ficoll-Dichtegradienten mit einer Dichte von 1,077 g/ml.

Eine Mischung aus 20 ml heparinisiertem Vollblut/ Knochenmarksaspirat und 20 ml Puffer (PBS saline Lösung, pH 7,4) wurde in 50 ml Röhrchen auf 20 ml des Ficoll-Dichtegradienten geschichtet. Nach Zentrifugation bei 2400 UpM für 25 Minuten entstand zwischen den unterschiedlichen Dichten ein Zellring mit lebenden mononukleären Zellen (PBMC). Dieser Zellring wurde vorsichtig abpipettiert und durch zweimaliges Waschen mit PBS-Waschpuffer wurde eine saubere Zellsuspension erlangt.

Tote Zellen weisen eine andere Dichte auf als lebende Zellen und waren somit nicht im unter den isolierten Zellen zu finden.

4.1.4 Erzeugen von dendritischen Zellen

Das durch einen Ficoll isolierte Pellet an mononukleären Zellen wurde zur Entfernung von Erythrozyten zweimalig mit Erylyse gewaschen. Anschließend inkubierte das Zellpellett in 15 ml RPMI-Nährmedium ohne weitere Zusätze in einer Kulturflasche für zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank. Während dieser Zeit lagerten sich die Monozyten lose adhären am Flaschenboden an.

Nach zwei Stunden wurden, unter Schonung der adhären Zellen, 14 ml des Nährmediums entfernt und durch 20 ml RPMI-Nährmedium mit 1% PS ersetzt.

Außerdem wurden dem Nährmedium 200 µl IL-4 und 62,7 µl Granulozyten-Makrophagen stimulierender Faktor (GM-CSF) zugefügt.

An Tag 3 und 5 erfolgte ein Mediumwechsel. Wir ersetzten das durch einen Farbwechsel erkennbare verbrauchte Medium durch ein Medium mit der gleichen Zusammensetzung wie an Tag 1. An Tag 7 erhielt das Nährmedium zusätzlich zu den anderen Zytokinen 800 µl TNF-alpha zur Ausreifung der dendritischen Zellen. Bis zum Tag 10 reiften die dendritischen Zellen aus. Die Kontrolle erfolgte mikroskopisch anhand der typischen Struktur einer dendritischen Zelle, sowie durchflusszytometrisch mit dem fluoreszenzmarkiertem AK DC Sign PE (CD209).

4.1.5 Isolation von CD3-positiven T-Zellen

Die Isolation von CD3-positiven T-Zellen erfolgte mit Hilfe des „Dyna[®] T Cell Negative Isolation Kit“ aus mononukleären Zellen, die zuvor über den Ficoll-Dichtegradienten aus heparinisiertem Vollblut isoliert wurden.

Zunächst wurden die Dynabeads[®] gewaschen. Die benötigte Anzahl an Dynabeads[®] wurde in ein 15 ml-Röhrchen aufgenommen und für eine Minute an den zugehörigen Magneten (Dyna[®] MPC[®]) gestellt. Dieses hatte zur Folge, dass sich Dynabeads[®] am Magneten anhafteten. Die überschüssige Flüssigkeit wurde aus dem Röhrchen abgesaugt und die Dynabeads[®] zur weiteren Verwendung in PBS/0,1% BSA aufgenommen.

Die CD3-negativen Zellen beluden wir nun mit entsprechender Anzahl an magnetischen AK nach Herstelleranweisung. Dafür wurden 1×10^7 mononukleäre Zellen in 100 µl PBS/0,1% BSA sowie 20 µl FCS und 20 µl Antikörpermischung aufgenommen und nach Zentrifugation und Absaugen des Überstandes mit den Dynabeads[®] für 15 min bei 20 °C inkubiert. Durch das Anlegen eines magnetischen Feldes lagerten sich die AK-beladenen, CD3-negativen Zellen am Magneten ab, so dass im Überstand lediglich CD3-positive T-Zellen zu finden waren. Diese Prozedur wurde mehrmals wiederholt, um eine möglichst reine T-Zell-Suspension zu erreichen. Die Kontrolle erfolgte durchflusszytometrisch mit dem fluoreszenzmarkiertem AK CD3-FITC. Routinemäßig wurden Quoten von über 90% erzielt.

4.1.6 Herstellung von Fusionsprodukten

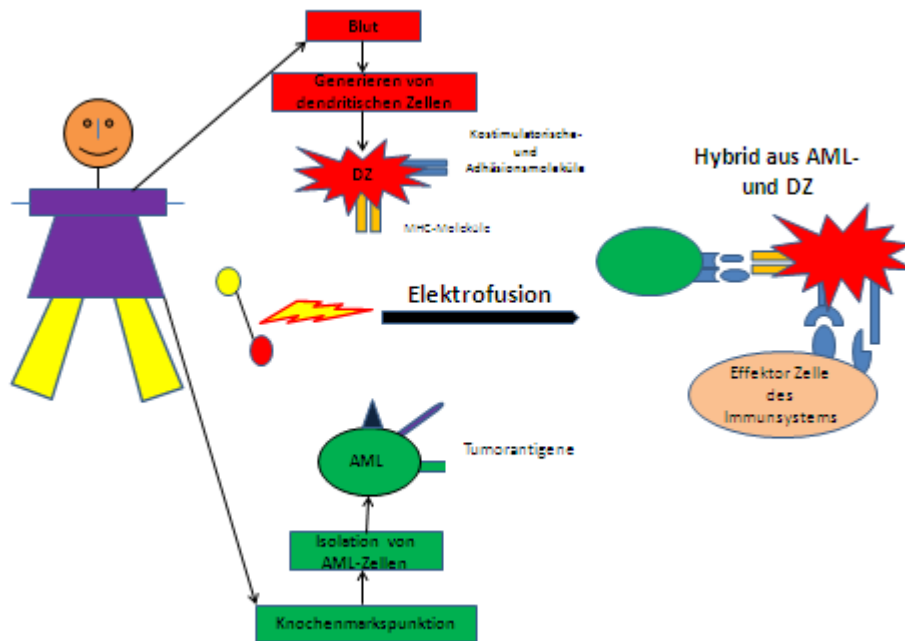
Für die Fusion der gewonnenen DZ mit AML-Tumorzellen verwendeten wir ein Verfahren basierend auf einer Kombination aus Polyethylenglycol (PEG) und Elektroporation (6) (Abbildung 1). Um die Fusionsrate nach vollendeter Fusion zu bestimmen, erfolgte zuerst eine Färbung von unfusionierten dendritischen Zellen und AML-Zellen.

Für die Kontrolle der Fusionsrate am Durchflusszytometer wurden sowohl die DZ als auch die AML-Blasten mit dem AK DC Sign PE, CD80 FITC und CD13 FITC gefärbt. Um die Fusion zusätzlich zur Durchflusszytometrie auch fluoreszenzmikroskopisch sichtbar machen zu können, erfolgte vor der Fusion eine weitere Färbung der dendritischen Zellen mit dem fluoreszierenden Farbstoff PKH-26-G1 (rot) und der AML-Blasten mit dem fluoreszierenden PKH-67-G1 (grün).

Für die Färbung mit diesen fluoreszierenden Farbstoffen wurden die Dendriten und die AML-Blasten in Portionen von 5×10^6 gewaschen und in 500 μ l Diluent C aufgenommen. Im Anschluss wurde für die dendritischen Zellen 8 μ l des roten Farbstoffes PKH 26 in 1 ml Diluent aufgenommen. Für die AML-Zellen wurden 4 μ l des grünen Farbstoffes PKH 67 in 1 ml Diluent aufgenommen. Jeweils 500 μ l dieses Farbstoff-Diluentgemisches wurden dann zur jeweiligen Zellsuspension gegeben. Dann erfolgte eine Inkubation bei 25 °C unter Lichtausschluss. Nach 4 Minuten erfolgte die Zugabe von 1 ml bovinem Albumin (BSA). Nach weiterer Inkubation von einer Minute wurden die Zellen in 2 ml RPMI resuspendiert und im Anschluss für 10 Minuten bei 400 g und einer Temperatur von 25 °C zentrifugiert. Zweimaliges Waschen in PBS Waschpuffer beendete den Färbevorgang.

Die gefärbten AML-Zellen wurden in einer Elektroporationscuvette für 200 μ s mit 200 V/cm mit Hilfe eines Elektroporators poriert. Die so behandelten AML-Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:4 zu den dendritischen Zellen gegeben. Nach Zentrifugation erfolgte unter ständigem Vortieren die Zugabe von jeweils 1 ml warmem Polyethylenglycol. Zur weiteren Verdünnung wurden dann innerhalb von 3 Minuten weiterhin unter Vortieren 8 ml RPMI zugegeben. Durch zweimaliges Waschen in PBS-Waschpuffer wurde überschüssiger Farbstoff entfernt. Wir inkubierten die fusionierten Hybridzellen in serumfreiem RPMI-1640 bei 37 °C im Brutschrank. Die weitere Verarbeitung erfolgte frühestens nach 24 Stunden, da die Zellen in der Kultur weiter fusionierten.

Abb.:1)

**Abbildung 1:** Schematische Darstellung Fusionsverfahren

Die gewonnenen DZ werden mit Hilfe einer Kombination aus Elektroporation und Polyethylenglycol fusioniert. Es resultieren Hybridzellen (HZ) aus beiden Zelltypen die mit Zellen des Immunsystems interagieren.

4.1.7 Isolation von Subpopulationen

Vor jeder Vakzinierung erfolgte ein DC-Sign-Panning zur Isolation der Subpopulation der HZ, um sicherzustellen, dass nur HZ und unfusionierte DZ vakziniert wurden und keinesfalls unfusionierte AML-Zellen. Für das Panning wurde ein Well einer 6-Well Flachbodenplatte mit 20 µl des AK IgG2b, 2 ml PBS und 0,2 ml autologem Serum gefüllt. Der AK setzte sich am Boden der Platte fest und diente als Bindungsantikörper. Das Gemisch wurde für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und autologem Serum wurden die HZ, die zuvor mit dem doppelt positivem AK DC Sign/ CD83 PE beladen wurden, dazugegeben. Während der Inkubation für weitere 30 Minuten bei 4 °C setzten sich die doppelt positiven Zellen am Bindungsantikörper am Plattenboden fest. Im Überstand befanden sich die unfusionierten AML-Zellen, die abgesaugt wurden. Die HZ konnten durch leichtes Schütteln vom Boden der Platte gelöst werden, um sie der weiteren Verwendung zuzuführen.

4.1.8 Bestimmung der Zellzahl und der Zellavidität

Die zur Bestimmung der Zellkonzentration entnommene Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau verdünnt. Trypanblau wird bei einer Membrandysfunktion aufgenommen und lässt somit gefärbte, tote Zellen von ungefärbten, lebenden Zellen unterscheiden. Wir bestimmten die Zellkonzentrationen der Zellsuspensionen durch die Multiplikation der Zellzahl eines Eckquadrates der Neubauer-Zählkammer mit dem Verdünnungsfaktor 2.

4.2 Immunhistochemische Arbeiten

4.2.1 Färben der Zellen für die Durchflusszytometrie

Um Zellen durchflusszytometrisch sichtbar zu machen, wurden sie mit fluoreszenzmarkierten AK gefärbt. Als Farbstoffe dienten FITC- oder PE-markierte monoklonale Antikörper gegen typische Oberflächenantigene der Zellen.

Die Färbelösung bestand aus 100 µl antikörpermarkiertem Farbstoff und 900 µl PBS. Die Zellen wurden zum Färben in Portionen von 200.000 in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und bei 1400 Umdrehungen für 4 Min zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes wurden die Zellen in 50 µl der Farbstoffsuspension aus antikörpermarkiertem Farbstoff und PBS im Verhältnis 1/10 resuspendiert. Nach zweistündiger Inkubation bei 8 °C im Kühlschrank beendete das Auswaschen des überschüssigen Farbstoffes durch zwei Waschvorgänge mit PBS/FCS 2% den Färbeprozess und die Zellen konnten am Durchflusszytometer gemessen werden.

4.2.2 Fluoreszenzmikroskopie

Nach 48-stündiger Kultur wurde die Fusion mittels eines Fluoreszenzmikroskopes überprüft. Durch die vorausgegangene Färbung mit den fluoreszierenden Farbstoffen PKH-26-G1 (rot) und PKH-67-G1 (grün) stellten sich unfusionierte DZ als rote und unfusionierte AML-Zellen als grüne Zellen dar. Hybride zeigten eine orange Färbung. Durch Zugabe von Propidiumjodid konnten lebende Hybride von toten differenziert werden, da das Propidiumjodid als Kernfarbstoff lediglich tote Zellen markieren kann.

4.3 Durchflusszytometrie

4.3.1 Standardzellen (SZ) und deren Gebrauch

Standardzellen dienen im Rahmen der Durchflusszytometrie durch Zugabe einer genau definierten Anzahl der Umrechnung der relativen Prozentangaben des Durchflusszytometers auf absolute Zellzahlen.

Bei den Standardzellen handelte es sich um radioaktiv bestrahlte Zellen der K562-Zelllinien. Diese Zellen wurden mit dem fluoreszenzmarkiertem-anti-CD13/33-PE-AK gefärbt. Durch Zugabe von PBS mit 4% Paraformaldehyd wurden die Zellen fixiert und dann in einen Puffer aus PBS mit 1% BSA aufgenommen.

Vor der Zugabe zu den anderen Zellen wurden die toten Standardzellen mit 0,2 µl Propidiumjodid gefärbt. Propidiumjodid ist ein Farbstoff, der sich an den Kern einer Zelle bindet und somit nur tote Zellen anfärbt. Auf diese Weise wurden die Standardzellen durchflusszytometrisch sichtbar und konnten zur Unterscheidung lebender von toten Zellen dienen.

4.3.2 Überwachung der Fusionsrate

24 Stunden nach erfolgter Fusion wurde die Fusionsrate durchflusszytometrisch überprüft. Die Zellen wurden in saliner PBS aufgenommen und auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Durch das vorherige Anfärben der dendritischen Zellen mit PKH-26 und der AML-Zellen mit PKH-67 stellten sich die Hybride fluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch als doppelpositive Zellen da.

Gleichzeitig wurde die Fusionsrate auch mit den AK DC Sign PE und CD 13 FITC überprüft. Durch Zugabe von mit 0,2 µl Propidiumjodid gefärbten Standardzellen in einer Konzentration von $10^5/100$ µl konnte die Anzahl der Hybride genau berechnet und tote Hybride konnten von lebenden unterschieden werden.

4.4 Molekularbiologische Arbeiten

4.4.1 Isolation von Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

Die DNA-Isolation aus EDTA-Blut erfolgte mittels QI Amp DNA Mini Kit (Quiagen) aus Vollblut.

200 µl EDTA-Blut wurden mit 200 µl AL-Puffer und 20 µl Protease vermischt und für

10 Sek vortiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation für 10 Min bei 56 °C. Nach wiederholtem Vortieren für 10 Sek wurden die Zellen für 15 Sek bei 8.000rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol erfolgte erneut eine Zentrifugation unter oben genannten Bedingungen. Das Gemisch wurde dann auf die QI Amp Spin Column-Säulen geschichtet und in 2 ml-Tubes gestellt. Nach Zentrifugation für 1 Min bei 8000rpm wurden die Säulen in ein neues 2 ml-Tube überführt. Im Anschluss erfolgte dreimaliges Waschen mit den Puffern AW1 und AW2. 200 µl H₂O wurden auf 70 °C vorgeheizt und auf die Zellsuspension geschichtet. Eine weitere Zentrifugation für 5 Min bei 8000rpm führte zur Elution der fertigen DNA. Die gewonnene DNA wurde in sterilem, destilliertem Wasser resuspendiert, auf eine Konzentration von 100 ng /µl eingestellt und diente der Weiterverwendung in einer PCR.

4.4.2 Isolation von Ribonukleinsäure (RNA)

Die RNA-Isolation aus EDTA-Blut erfolgte mit Hilfe des Rneasy Mini-Kit von Qiagen. Die AML-Zellen wurden in einer Konzentration von 10⁷ Zellen in 2 ml PBS aufgenommen und bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 600 µl RLT-Puffer aufgenommen und resuspendiert. Das Zelllysat wurde dann in eine QIA-shredder-spin-Säule überführt, die in einem 2 ml-Tube für 2 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert wurde. Die QIA-shredder-spin-Säule wurde verworfen. Das Zelllysat im 2 ml-Tube wurde mit 600 µl Ethanol 70% verdünnt. Das Gemisch wurde in zwei Rneasy-mini-Säulen überführt, die jeweils in ein 2 ml-Tube gestellt wurden. Durch erneute Zentrifugation für 15 sek bei maximaler Geschwindigkeit absorbierte die Membran der Säulen die herausgelöste RNA. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit den Puffern RW1 und RPE. Im Anschluss wurde die RNA durch Zugabe von 5 µl H₂O und Zentrifugation für 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit eluiert.

4.4.3 cDNA Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte aus isolierter RNA. Hierzu wurden zu 11,5 µl des Mastermixes, bestehend aus dntp, reverser Transkriptase, Random Primer, R-Nasin, 5xPuffer und DTT, 13 µl der zuvor gewonnen RNA gegeben. Nach Vortieren für 15 Sek wurde das Gemisch in den Thermocycler überführt. Es folgte die Inkubation für 60 Min bei 37 °C und für 15 Min bei 99 °C. Im Anschluss war die cDNA fertig und wurde nach der Synthese sofort für die nested-PCR verwendet.

4.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur HLA Typisierung

Bei der Typisierung wurde lediglich das HLA A/B/C-System berücksichtigt.

Die Typisierung wurde mittels HLA-SSP-Kit durchgeführt. Diese Methode nutzt Allel-spezifische Primer in der Amplifikationsmethode. Das Prinzip beruht darauf, dass nur Primer, deren Sequenz vollständig komplementär zur Zielsequenz einer vorliegenden DNA-Probe sind, an diese DNA binden und in einer PCR-Reaktion ein Amplifikat erzeugen. Nicht komplementäre Primer binden nicht an die DNA und es findet keine Amplifikation statt.

Entsprechend den Herstellerhinweisen wurde ein sogenannter Mastermix aus einem PCR-Cocktail, einer Taq DNA-Polymerase und destilliertem H₂O hergestellt und zur isolierten DNA hinzugegeben. Von diesem Mastermix wurden jeweils 10 µl zu den getrockneten Primermixes mittels einer Multipette pipettiert. Die PCR-Streifen wurden mit Deckelstreifen verschlossen und kurz zentrifugiert, um DNA und Primer zu vermengen. Im Anschluss wurden die Streifen in den Thermocycler überführt und das empfohlene Herstellerprogramm Biotest SSP wurde gestartet.

Programm des „Thermal Cycler“

Initiale Denaturierung	95 °C	2 Min.
Denaturierung	94 °C	10 Sec.
Annealing	61 °C	30 Sec.
Extension	72 °C	50 Sec.
Endgültige Extension	72 °C	30 Sec.
Zyklen		20x

4.4.5 Agarose Gelelektrophorese

Die PCR-Reaktion wurde mit einem zweiprozentigen Agarosegel in 1xTBE-Puffer analysiert, der 1,6 µl/100 ml Ethiumbromid enthält. Die Elektrophorese erfolgte für 15-25 Minuten bei 8V/cm. Abhängig von der Fragmentgröße wurden entweder 100 bp DNA "Ladder" (1kb) oder "GeneRuler DNA Ladder" Mix (10kb) verwendet. Die DNA-Banden wurden unter dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

4.4.6 Nested-PCR

Die nested-PCR wurde zur Identifikation des Fusionsgens der AML inv(16) durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit, auch sehr geringe Mengen an Templaten nachzuweisen. Bei einer nested-PCR wird das PCR-Produkt der ersten PCR in eine zweite eingesetzt. Das Primerpaar der zweiten PCR liegt dabei zwischen den Primern der ersten Reaktion. Dadurch werden falsche Amplifikationen der ersten PCR ausgesondert. Für die nested-PCR wurde zur gewonnenen cDNA ein Mastermix aus einem Puffer, MgCl₂, dntp, Tag-Polymerase, H₂O und den Primern MYH11-ex-down1 und CBFbeta- μ p3 hinzugegeben. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie bei der oben beschriebenen PCR zur HLA-Typisierung. Von dem Produkt der PCR wurde 1 μ l erneut mit einem Mastermix aus den oben stehenden Produkten vermischt und eine weitere PCR durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Agarose Gelelektrophorese und einer Produktaufreinigung wie oben beschrieben. Das Fusionsgen lag vor, wenn die Länge des Produktes der ersten PCR 455 bp und die des Produktes der zweiten PCR 411bp betrug.

Programm des „Thermal Cycler“

Initiale Denaturierung	94 °C	90 Sec.
Denaturierung	94 °C	15 Sec.
Annealing	64 °C	45 Sec.
Extension	72 °C	45 Sec.
Endgültige Extension	72 °C	6Sec.
Zyklen: PCR I		35x
PCR II		11x

4.5 Funktionelle Zellkulturversuche

4.5.1 Proliferationstest

Aus peripherem heparinisiertem Venenblut isolierten wir über den Ficoll Dichtegradienten mononukleäre Zellen. Aus diesen wurden mit Hilfe des TC-Negative-Isolation-Kit die CD3-positiven T- Lymphozyten isoliert.

Die so gewonnenen CD3-positiven T-Zellen wurden in einer Konzentration von 1×10^5

Zellen pro Well in eine 96 Well-Rundbodenplatten pipettiert. In einem Verhältnis von 1:5 wurden Targetzellen zu den T-Zellen hinzugegeben. Als Targetzellen dienten bestrahlte AML-Zellen von inv(16)-positiven und inv(16)-negativen AML-Patienten, DZ gesunder Spender, DZ von AML inv(16)-Patienten und Fusionsprodukte aus diesen DZ und AML-Zellen. Bezüglich der HLA-A-Kompatibilität wurde bei den unterschiedlichen HZ variiert (HZ aus HLA-Identischen AML-Zellen und DZ; HZ aus HLA nicht-identischen AML-Zellen und DZ). Ebenso wurden sowohl allogene als auch autologe T-Zellen als Effektorzellen eingesetzt. Als Kontrolle dienten T-Zellen ohne Targetzellen und Targetzellen ohne T-Zellen. Die Wells wurden mit 200 µl RPMI-Nährmedium mit 20U IL-2/ml, 10% FCS und 1% PS aufgefüllt.

Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden mit den durch Fluoreszenz markierten Antikörpern CD3-FITC und CD8-FITC.

Durch Zugabe von Standardzellen und Propidiumjodid (PJ) konnten tote T-Zellen von lebenden unterschieden werden. Die proliferative Aktivität wurde als Verhältnis der Anzahl der T-Zellen in der Effektor/Target-Kultur zu der Anzahl der T-Zellen, die nur mit Nährmedium ohne Targetzellen kultiviert wurden, angegeben.

4.5.1.1 Proliferationstests mit T-Zellen gesunder Spender

Wir fusionierten dendritische Zellen eines gesunden Spenders (HLA-A1) mit inv(16)-positiven AML-Zellen (HLA-A1, -A2 und -A24). Isolierte T-Zellen von drei gesunden Spendern der Haplotypen HLA-A1, -A2 und -A3 wurden im Rahmen eines Proliferationstests mit den oben genannten DZ, bestrahlten Hybridzellen sowie allogenen PBMCs für 24 Stunden kultiviert.

Ebenfalls wurden T-Zellen von zwei gesunden Spendern (HLA-A1 und A2) durch Fusionsprodukte aus DZ eines inv(16)-positiven AML-Patienten (HLA-A24) und inv(16)-positiven AML-Zellen (HLA-A1, A2 und A24), unfusionierten AML-Zellen sowie allogenen PBMCs für 24 Stunden stimuliert.

Für den Nachweis einer T-Zell-Antwort durch ein HLA-identisches Fusionsprodukt eines inv(16)-positiven AML-Patienten, wurden T-Zellen von drei gesunden Spendern (HLA-A1, A2 und A3) isoliert. Im Rahmen eines Proliferationstests wurden diese T-Zellen mit DZ, autolog zu den inv(16)-positiven AML-Zellen des Haplotyps HLA-A1, Fusionsprodukten bestehend aus diesen DZ und autologen sowie allogenen inv(16)-

Zellen (HLA-A1, HLA-A2 und -A24) sowie allogenen PBMCs für 24 Stunden stimuliert.

Um zu untersuchen, ob HZ, bei denen inv(16)-negative AML-Zellen mit DZ fusioniert wurden, den gleichen aktivierenden Effekt auf T-Zellen haben wie HZ mit inv(16)-positiven Zellen, stellten wir Fusionsprodukte aus DZ des Haplotypen HLA-A1, autologen sowie allogenen inv(16)-positiven AML-Zellen (HLA-A1, A2 und -A24) und inv(16)-negativen Zellen (HLA-A1) her. Ebenfalls wurden T-Zellen von drei gesunden Spendern (HLA-A1 und -A2) isoliert. Im Rahmen eines Proliferationstests wurden diese T-Zellen mit den oben genannten Fusionsprodukten sowie allogenen PBMCs für 24 Stunden stimuliert.

Bei den oben beschriebenen Proliferationstests wurde die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen als Reaktion auf die Stimulatoren durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression untersucht.

4.5.1.2 Proliferationstest mit T-Zellen von AML- Patienten

Zur Orientierung über eine mögliche Stimulation autologer sowie allogener T-Zellen von inv(16)-positiven AML-Patienten durch Hybridzellen wurden folgende Proliferationstests durchgeführt.

Um nachzuweisen, dass durch eine Stimulation mit HZ auch T-Zellen von inv(16)-positiven AML-Patienten aktiviert werden, isolierten wir die T-Zellen von drei Patienten mit einer AML inv(16) (HLA-A1,-A2 und A24). Im Rahmen eines Proliferationstestes wurden diese T-Zellen mit DZ eines inv(16)-positiven AML-Patienten (autolog zu den T-Zellen des Haplotyps HLA-A24), Fusionsprodukten bestehend aus diesen DZ und autologen sowie allogenen inv(16)-positiven AML-Zellen der Haplotypen HLA-A1,-A2 und A24, unfusionierten AML-Zellen dieser Haplotypen sowie allogenen PBMCs für 24 Stunden stimuliert. Um zu untersuchen, ob ein autologes Fusionsprodukt eines anderen Haplotyps als HLA-A24 in der Lage ist, autologe T-Zellen von inv(16)-positiven AML-Patienten zu stimulieren, wurden DZ der Haplotypen HLA-A1 und -A2 mit autologen sowie allogenen inv(16)-Zellen der Haplotypen HLA-A1, -A2 und -A24 fusioniert. Ebenfalls wurden die T-Zellen der inv(16)-Patienten der Haplotypen HLA-A1 und -A2 isoliert. Im Rahmen eines Proliferationstestes wurden diese T-Zellen mit autologen sowie allogenen DZ, den Fusionsprodukten sowie allogenen PBMCs für 24 Stunden stimuliert.

Um zu untersuchen, ob HZ, bei denen inv(16)-negative AML-Zellen mit DZ fusioniert wurden, den gleiche aktivierenden Effekt auf T-Zellen haben wie HZ mit inv(16)-positiven AML-Zellen, fusionierten wir DZ eines inv(16)-Patienten des Haplotyps HLA-A1 mit autologen inv(16)-positiven AML-Zellen und inv(16)-negativen AML-Zellen (HLA-A1). Ebenfalls wurden T-Zellen von AML inv(16)-Patienten (HLA-A1 und HLA-A2) isoliert. Diese T-Zellen wurden im Proliferationstest mit den DZ, den oben genannten Fusionsprodukten, unfusionierten AML-Zellen sowie allogenen PBMCs für 24 Stunden stimuliert.

Bei den oben beschriebenen Proliferationstesten wurde die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen als Reaktion auf die Stimulatoren durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression untersucht.

4.5.2 Heilungsversuch

Der Heilungsversuch wurde bei einer Patientin durchgeführt, die zum Zeitpunkt ihrer Diagnosestellung (05/2000) 59 Jahre alt war. Eine verstärktes Müdigkeitsempfinden sowie eine ungewöhnlich lang anhaltende Blutung bei einer Parodontitisbehandlung führten zur Vorstellung. Es zeigten sich nach NCI-Kriterien (National Cancer Institut) eine Granulopenie Grad IV, eine Thrombopenie Grad III und 1900 periphere Blasten/ μ l im Blut. Die Knochenmarksdiagnostik ergab einen myelomonozytären Blastenanteil von ca. 70% bei Peroxidase- und Esterase- Positivität mit typischer Eosinophilie und dem Auftreten von Mikrokaryozyten. Die klassische Zytogenetik bestätigte die inversion(16) Aberration (p13;q22) sowie die molekulare Expression von CBFbeta-MYH11 TypA in einem beta2-microglobulin Quotienten von 32420. Trotz wiederholter verschiedener Chemotherapiezyklen und Rezidivchemotherapie erlitt die Patientin immer wieder einen Rückfall der Erkrankung. Bei fehlendem KM-Spender, intensiver Aufklärung sowie Einverständnis durch die Patientin wurde im Rahmen des 5. Rezidivs auf dem Boden der in vitro-Ergebnisse ein Konzept für einen Heilungsversuch mit immuntherapeutischem Ansatz erarbeitet. Hierbei wurden im Abstand von Tagen erstmals drei s.c. Vakzinierungen, mit bestrahlten Fusionszellen bestehend aus autologen dendritischen Zellen und AML-Blasten ohne Adjuvans, konsolidierend durchgeführt. Um nachzuweisen, dass die Vakzinierung mit HZ zu einer AML-Zellen-spezifischen Immunantwort führt, wurden in vitro Analysen mit aus Knochenmark gewonnenen T-Zellen sowohl vor als auch nach Vakzinierung durchgeführt.

Die HZ wurden an Tag 1 nach erfolgter Fusion einem Panning unterzogen und bei 6.000 Gy bestrahlt. Dadurch stellten wir sicher, dass keinesfalls aktive, unfusionierte Blasten vakziniert wurden. Im Anschluss wurden die HZ dreimal gewaschen und in 500 µl Aqua ad inectabla aufgenommen. Die Vakzinierung erfolgte subkutan unter die Bauchhaut nach unten beschriebenem Zeitschema.

Der erste Heilungsversuch erfolgte mit einer niedrigen HZ-Dosis in geringer Vakzinierungsfrequenz. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse des ersten Heilungsversuches führten wir einen zweiten Versuch bei derselben Patientin mit einer höheren Dosis der HZ in der Vakzine in höherer Frequenz durch (Abbildung 2; Abbildung 3). Die Kontrolle erfolgte in vitro im Rahmen von Proliferationstests.

Hierbei wurden sowohl vor als auch nach Vakzinierung autologe T-Zellen mit bestrahlten autologen AML-Zellen als Target in einem Verhältnis von 20/1 kultiviert. Als Kontrolle für die Reaktion der T-Zellen wurden Spender-T-Zellen desselben Haplotyps mit den AML-Zellen kultiviert. Als Kontrolle für die Targetzellen dienten allogene inv(16)-negative AML-Zellen und allogene Spender-PBMCs.

Die Auswertung erfolgte sowohl nach 24h als auch nach 48h durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3- und CD8-Expression. Die proliferative Aktivität wurde als Verhältnis der Anzahl der T-Zellen in der Effektor/Target-Kultur zu der Anzahl der T-Zellen, die nur mit Nährmedium ohne Targetzellen kultiviert wurden, angegeben.

Abb.: 2) 1. Heilungsversuch

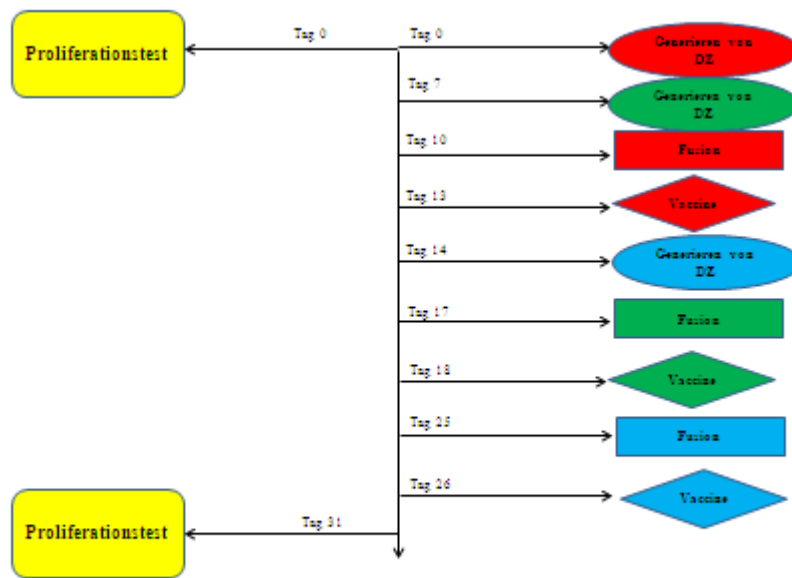


Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf des 1. Heilungsversuchs

Abb.: 3) 2. Heilungsversuch

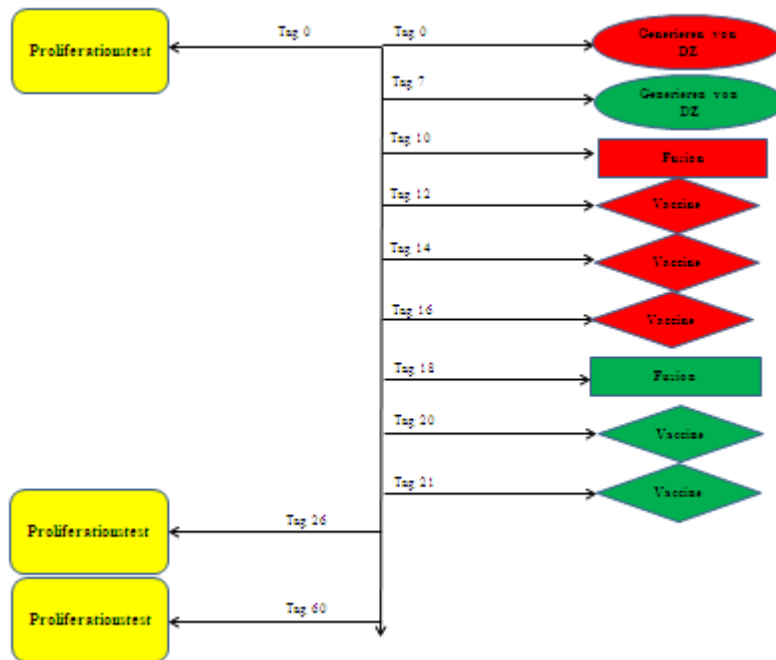


Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf des 2. Heilungsversuchs

4.6 Statistik

Die statistische Methode besteht in einer deskriptiven Statistik mit Prüfung auf Normalverteilung der stetigen Variablen. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte als Säulendiagramme. Eine statistische Auswertung mit Vergleichstestung ist beim Einzelfall/Heilversuch nicht sinnvoll.

(Votum der AG Statistik Gießen, Hochschulrechenzentrum; September 2013)

5 Ergebnisse

5.1 Verifizierung der Fusionsrate

Zur Orientierung der vor Fusion mit dem Membranfarbstoff PKH-67 angefärbten Zellen bestimmten wir den Anteil der Zellen, die den myeloischen Oberflächenmarker CD13 exprimierten. Die mit dem Membranfarbstoff PKH-26 angefärbten Zellen wurden durch das Oberflächenantigen CD209 näher klassifiziert. Über 60% der Zellen, die durch das oben beschriebene Verfahren zur Erzeugung von dendritischen Zellen gewonnen wurden, exprimierten die genannten Marker.

Nach erfolgter Fusion wurden die Zellen erneut mit den oben genannten Antikörpern gegen die Oberflächenantigene dendritischer Zellen und AML-Blasten gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Über 60% der Zellen zeigten eine doppelt positive Fluoreszenz.

In einem unfusionierten, mit oben genannten fluoreszierenden Antikörpern gefärbten Gemisch dendritischer Zellen und AML-Blasten zeigten sich keine doppelt positiven Zellen (Abbildung 4).

Diese Daten wurden durch fluoreszenzmikroskopische Bilder bestätigt, bei denen unfusionierte DZ durch die vorausgegangene Färbung mit dem Farbstoff PKH-26 rot, AML-Zellen nach Färbung mit dem Farbstoff PKH-67 grün und HZ gelb erschienen. Die Anzahl der HZ stieg innerhalb 24 Stunden nach erfolgter Fusion an. Deutlich sichtbar waren auch Kernpolymorphismen der HZ.

Abb.: 4)

Facs Bilder zur Fusionskontrolle

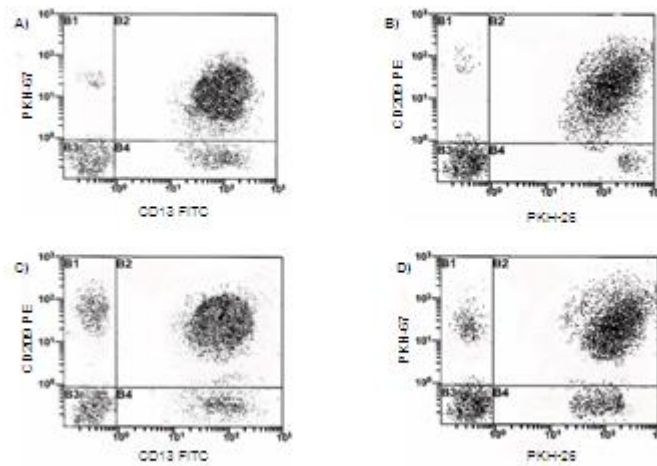
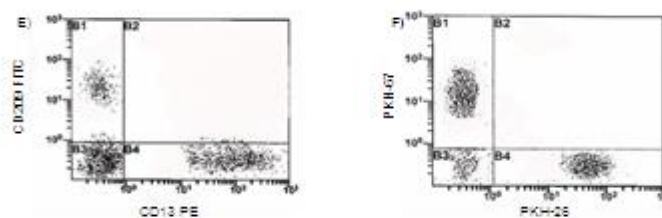


Abbildung 4: FACS-Bilder zur Kontrolle der Fusionsrate (A) PKH-67 Fluoreszenz auf AML-Zellen. (B) PKH-26 Fluoreszenz auf DZ. (C) Doppelfärbung mit CD13 und CD209 auf fusionierte Hybridzellen. (D) Doppelfärbung mit PKH-26 und PKH-67 auf fusionierte Hybridzellen.



(E) Doppelfärbung mit CD209 und CD13 von unfusionierten AML-Zellen und DZ. (F) Doppelfärbung mit PKH-67 und PKH-26 von unfusionierten AML-Zellen und DZ. Die Oberflächenfluoreszenz-Intensität wurde mit Hilfe eines Durchflusszytometers bestimmt.

5.1.1 Nachweis des Fusionsgens bei den inv(16)-positiven Fusionsprodukten

Für den indirekten Nachweis der vermuteten Antigenexprimierung führten wir bei den Fusionsprodukten, bei denen inv(16)-positive AML-Zellen verwendet wurden, ein Western Blotting durch. Es gelang der kontinuierliche Nachweis des Fusionsgens während der gesamten Kultivierungsphase.

5.2 Proliferationsanalyse gesunder Spender-T-Zellen auf Stimulatorzellen

5.2.1 Stimulation durch Spender-DZ und HZ

Verschieden Hybridzellen aus dendritischen Zellen eines gesunden Spenders (HLA-A1), inv(16)-positiven AML-Zellen unterschiedlicher HLA-Typen sowie unfusionierte PBMCs dienten T-Zellen gesunder Spender als Stimulatoren.

Alle T-Zellen zeigten eine starke proliferative Reaktion gegenüber den allo genen PBMCs und den dendritischen Zellen. Ebenfalls zeigten die T-Zellen eine proliferative Reaktion auf die Hybridzellen. Hierbei fand sich, unabhängig vom Haplotyp der Effektorzellen, die stärkste Reaktion bei der Stimulation mit dem Fusionsprodukt aus DZ und AML-Zellen des Haplotyps HLA-A2. Auffallend war, dass die T-Zellen des Haplotyps HLA-A3 deutlich geringer auf die Targetzellen reagierten als die T-Zellen der anderen Haplotypen (Abbildung 5).

5.2.2 Stimulation durch Patienten-DZ und HZ

Fusionshybride aus dendritischen Zellen eines inv(16)-positiven AML-Patienten (HLA-A24) und inv(16)-positiven AML-Zellen unterschiedlicher Haplotypen, unfusionierte AML-Zellen und PBMCs dienten T-Zellen gesunder Spender als Stimulatoren.

Unabhängig vom Haplotyp zeigten die T-Zellen die stärkste Reaktion auf die Stimulation durch die allo genen PBMCs. Ebenfalls unabhängig vom Haplotyp zeigten die T-Zellen der Spender eine Reaktion auf die Stimulation durch die HZ. Hierbei zeigte sich erneut die stärkste Reaktion bei dem Fusionsprodukt mit den AML inv(16)-positiven Zellen des Haplotyps HLA-A2. Die T-Zellen des Haplotyps HLA-A2 reagierten auf die Stimulierung durch die HZ stärker als die T-Zellen des Haplotyps HLA-A1. Auf die Stimulation durch die DZ reagierten die T-Zellen wie auf die

Stimulation durch HZ. Nur die T-Zellen des Haplotyps HLA-A2 zeigten eine geringe Reaktion auf die unfusionierten AML-Zellen des Haplotyps HLA-A24. Auf die unfusionierten AML-Zellen anderer Haplotypen reagierte keine der Spender-T-Zellen (Abbildung 6).

5.2.3 Stimulation durch HZ mit autologen /allogenen AML-Zellen

T-Zellen von gesunden Spendern (HLA-A1, A2 und A3) wurden mit DZ, autolog zu den AML inv(16)-Zellen des Haplotyps HLA-A1, Fusionsprodukten bestehend aus diesen DZ und autologen sowie allogenen inv(16)-positiven AML-Zellen (HLA-A1, HLA-A2 und -A24) sowie allogenen PBMCs stimuliert. Die T-Zellen der Haplotypen HLA-A1 und HLA-A2 zeigten eine Reaktion auf die HZ, auch auf das HLA-identische Fusionsprodukt. Die stärkste Reaktion auf HZ fand bei Stimulation mit dem Fusionsprodukt aus DZ und inv(16)-positiven AML-Zellen des Haplotyps HLA-A2 statt. Die T-Zellen mit dem Haplotyp HLA-A3 zeigten keine Reaktion auf die HZ. Unabhängig vom Haplotyp zeigten die T-Zellen eine starke Reaktion auf die Stimulierung durch allogene PBMCs. Auf die Stimulation durch die DZ zeigten nur die T-Zellen des Haplotyps HLA-A2 eine proliferative Aktivität (Abbildung 7).

5.2.4 Stimulation durch HZ mit AML inv(16)-positiven und AML inv(16)-negativen Zellen

Den Unterschied der Aktivierungsfähigkeit durch inv(16)-positiven und inv(16)-negativen AML-Zellen untersuchten wir mit Fusionsprodukten aus Patienten-DZ (HLA-A1), autologen sowie allogenen inv(16)-positiven AML-Zellen und inv(16)-negativen AML-Zellen.

Die T-Zellen zeigten unabhängig vom Haplotyp eine starke Reaktion auf die allogenen PBMCs, etwas geringer auf die allogenen DZ, sowie auf die HZ, die aus DZ und inv(16)-positiven Zellen bestanden. Die T-Zellen des Haplotyps HLA-A1 und -A2 reagierten auf die Stimulierung durch die Fusionsprodukte mit inv(16)-positiven Zellen des Haplotyps HLA-A2 stärker als auf das Fusionsprodukt, bei dem autologe Zellen miteinander fusioniert worden waren. Die Reaktion der T-Zellen des Haplotyps HLA-A2 fiel deutlich stärker aus als die Reaktion der T-Zellen des Haplotyps HLA-A1 (Abbildung 8).

Abb.: 5)

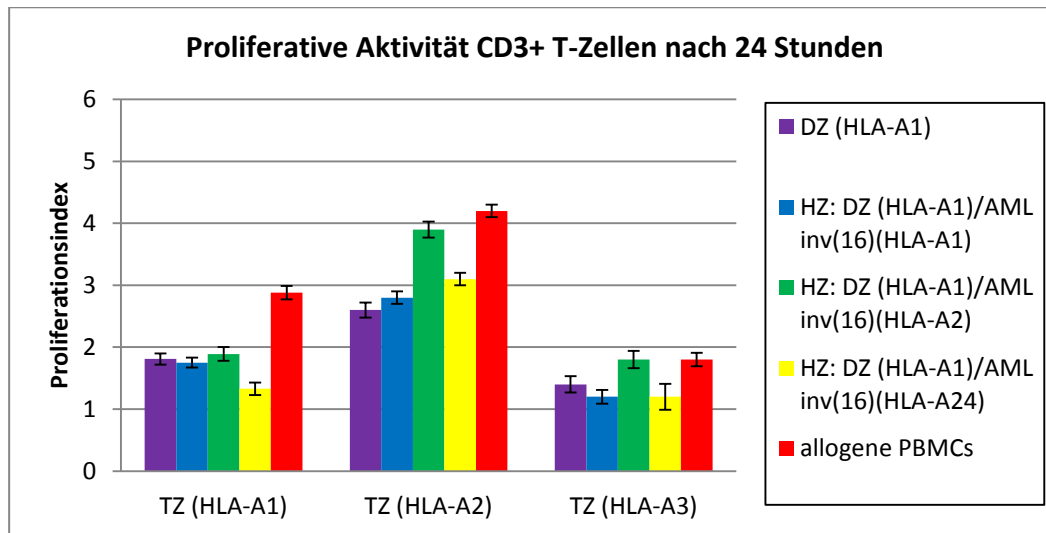


Abbildung 5: Proliferative Aktivität gesunder Spender-TZ als Reaktion auf verschiedene Stimulatorzellen. Als HZ dienten Fusionsprodukte aus den Spender-DZ und inv(16)-positiven AML-Zellen. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

Abb.: 6)

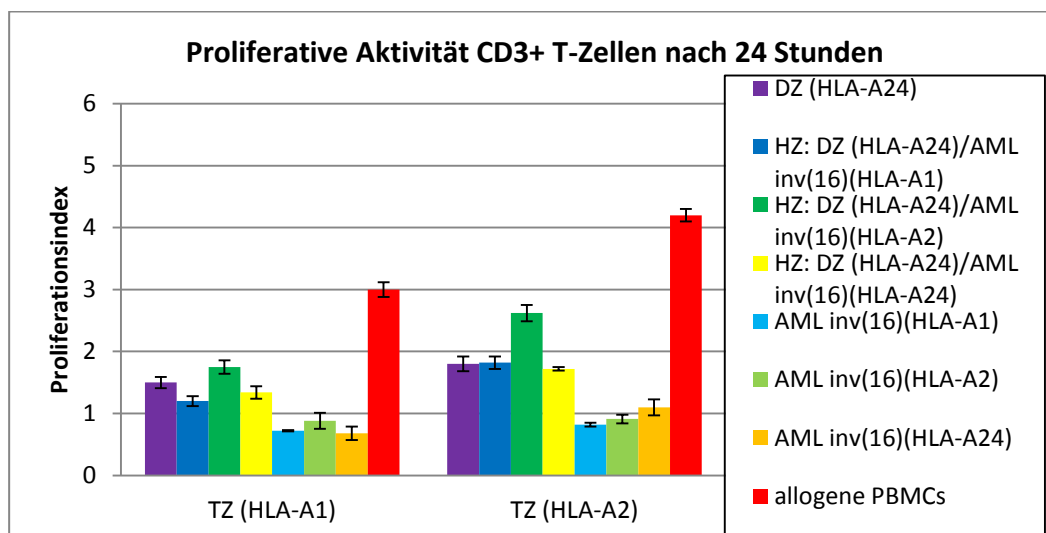


Abbildung 6: Proliferative Aktivität gesunder Spender-TZ als Reaktion auf verschiedene Stimulatorzellen. Als HZ dienten Fusionsprodukte aus DZ eines inv(16)-positiven AML- Patienten und inv(16)-positiven AML-Zellen. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

Abb.:7)

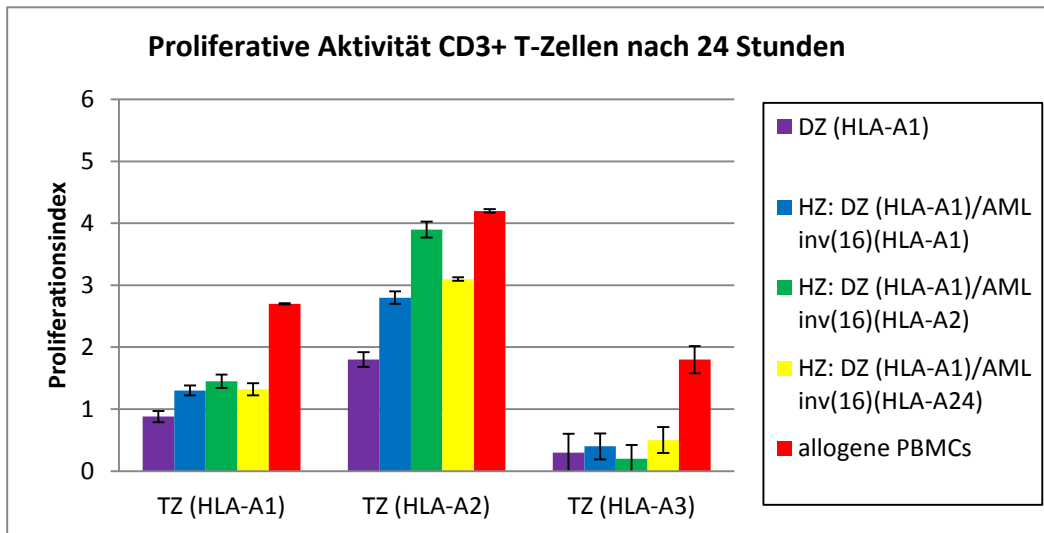


Abbildung 7: Proliferative Aktivität gesunder Spender-TZ als Reaktion auf verschiedene Stimulatorzellen. Als HZ dienten Fusionsprodukte aus DZ eines inv(16)-positiven AML-Patienten und autologen sowie allogenen inv(16)-positiven AML-Zellen. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

Abb.: 8)

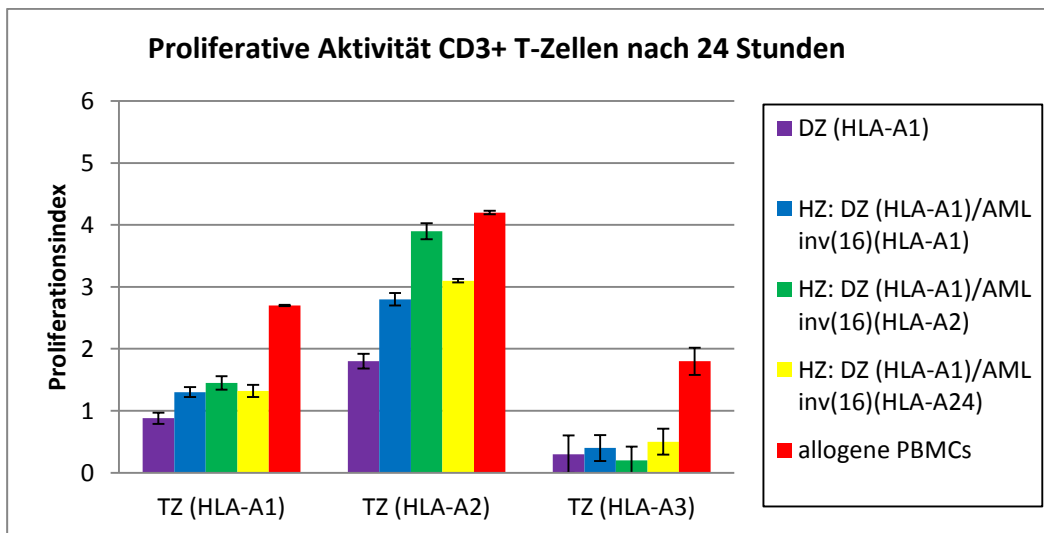


Abbildung 8: Proliferative Aktivität gesunder Spender-TZ als Reaktion auf verschiedene Stimulatorzellen. Als HZ dienten Fusionsprodukte aus DZ eines inv(16)-positiven AML-Patienten und inv(16)-positiven sowie inv(16)-negativen Zellen. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

5.3 Proliferationsanalyse von Patienten-T-Zellen auf Stimulatorzellen

5.3.1 Stimulation durch Patienten-DZ, HZ und unfusionierte AML-Zellen

T-Zellen von drei Patienten mit einer inv(16)-positiven AML (HLA-A1,-A2 und A24) wurden mit DZ eines AML inv(16)-Patienten (autolog zu den TZ des Haplotyps HLA-A24), Fusionsprodukten bestehend aus diesen DZ und autologen sowie allogenen AML inv(16)-Zellen, unfusionierten AML-Zellen sowie allogenen PBMCs stimuliert. Unabhängig vom Haplotyp reagierten die T-Zellen mit einer starken proliferativen Reaktion auf die Stimulation durch die allogenen PBMCs. Diese Reaktion war geringer ausgeprägt als bei den T-Zellen gesunder Spender. Die T-Zellen des Haplotyps HLA-A24 reagierten deutlich geringer als die T-Zellen anderer Haplotypen.

Nur die T-Zellen des Haplotyps HLA-A2 zeigten eine Reaktion auf die HZ, wobei die Reaktion auf die HZ mit den autologen inv(16)-positiven AML-Zellen des Haplotyps HLA-A2 am stärksten ausfiel. Ebenso zeigten diese T-Zellen eine Reaktion gegenüber den unfusionierten AML inv(16)-Zellen des Haplotyps HLA-A1. Auf die Stimulation mit unfusionierten AML inv(16)-Zellen wurde keine Reaktion beobachtet. Die allogenen T-Zellen reagierten auch auf die Stimulation durch DZ (Abbildung 9).

5.3.2 Stimulation durch autologe DZ, autologe sowie allogene HZ

Um zu untersuchen, ob ein autologes Fusionsprodukt eines anderen Haplotyps als HLA-A24 eine Aktivierungsfähigkeit für autologe T-Zellen von inv(16)-positiven AML-Patienten hat, wurden DZ mit autologen sowie allogenen inv(16)-positiven AML-Zellen (HLA-A1, -A2 und -A24) fusioniert. Im Rahmen eines Proliferationstestes wurden diese T-Zellen mit autologen sowie allogenen DZ, den Fusionsprodukten sowie allogenen PBMCs für 24 Stunden stimuliert.

Die T-Zellen zeigten eine deutliche Reaktion auf die HZ, wobei die Reaktion auf die HZ mit den inv(16)-positiven AML-Zellen des Haplotyps HLA-A2 erneut am stärksten ausfiel. Die T-Zellen beider Haplotypen reagierten auch auf die autologen Fusionsprodukte. Die Stimulation mit allogenen PBMCs rief die stärkste proliferative Reaktion hervor. Auf die Stimulation mit den autologen, unfusionierten DZ wurden keine Reaktion beobachtet (Abbildung 10).

5.3.3 Stimulation durch HZ mit inv(16)-positiven und -negativen AML-Zellen

Fusionsprodukte aus DZ eines inv(16)-positiven Patienten des Haplotyps HLA-A1, autologen AML-Zellen und inv(16)-negativen Zellen (HLA-A1), unfusionierte DZ, AML-Zellen sowie allogenen PBMCs dienten TZ von AML inv(16)-Patienten (HLA-A1 und HLA-A2) als Stimulatoren.

Die T-Zellen zeigten unabhängig vom Haplotyp die stärkste Reaktion auf die allogenen PBMCs. Ebenfalls reagierten die T-Zellen auf die Stimulation durch die HZ, bei denen autologe Zellen fusioniert worden waren. Auf die Stimulation durch die HZ mit den inv(16)-negativen Zellen sowie auf die Stimulation mit unfusionierten Zellen wurde keine Reaktion beobachtet (Abbildung 11).

Abb.: 9)

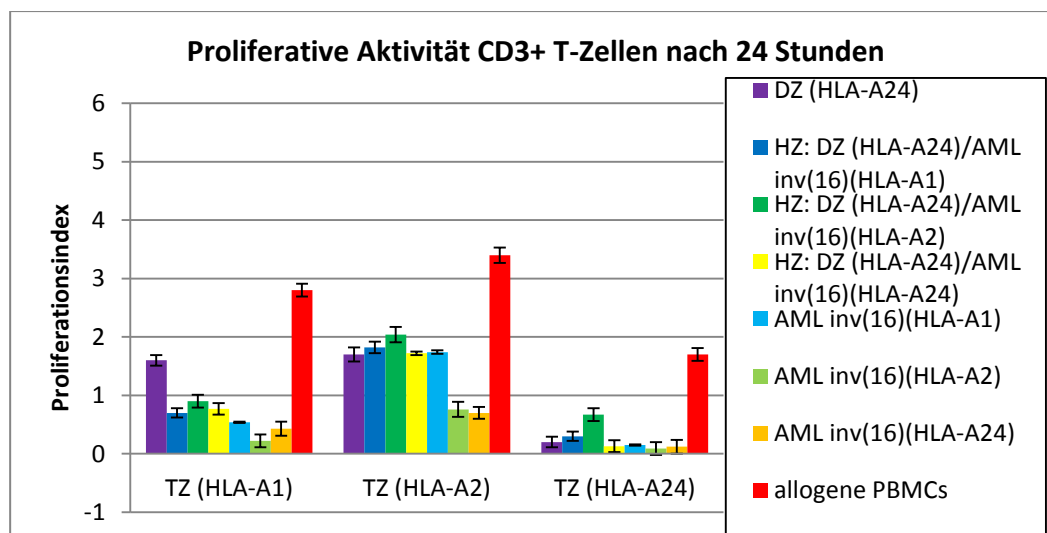


Abbildung 9: Proliferative Aktivität von TZ von inv(16)-positiven Patienten als Reaktion auf verschiedene Stimulatorzellen. Als HZ dienten Fusionsprodukte aus DZ des inv(16)-positiven AML-Patienten (HLA-A24) und autologen sowie allogenen AML inv(16)-Zellen. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

Abb.: 10)

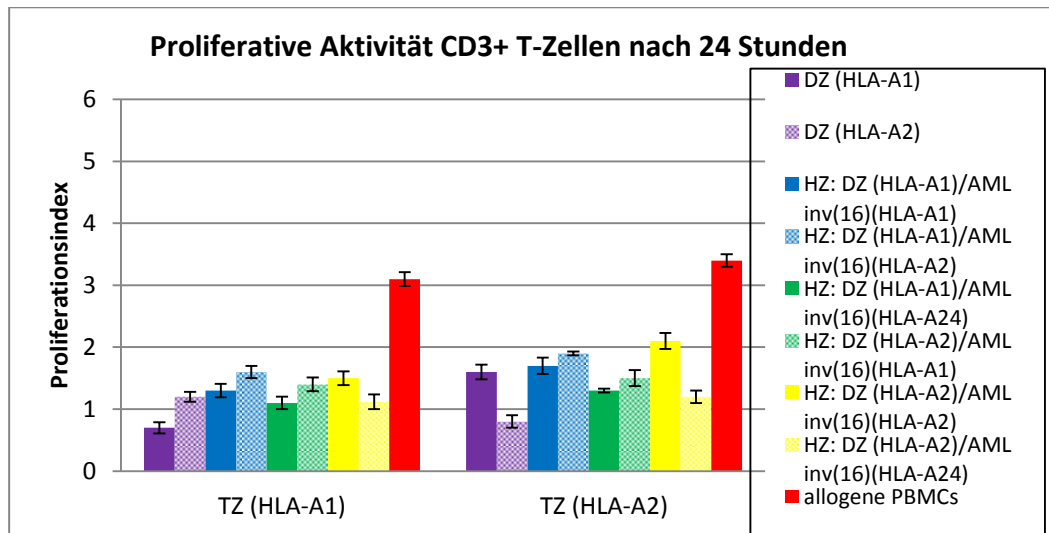


Abbildung 10: Proliferative Aktivität von TZ von inv(16)-positiven AML-Patienten als Reaktion auf verschiedene Stimulatorzellen. Als HZ dienten Fusionsprodukte aus DZ der Patienten und allogenen sowie autologen inv(16)-positiven AML-Zellen. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

Abb.: 11)

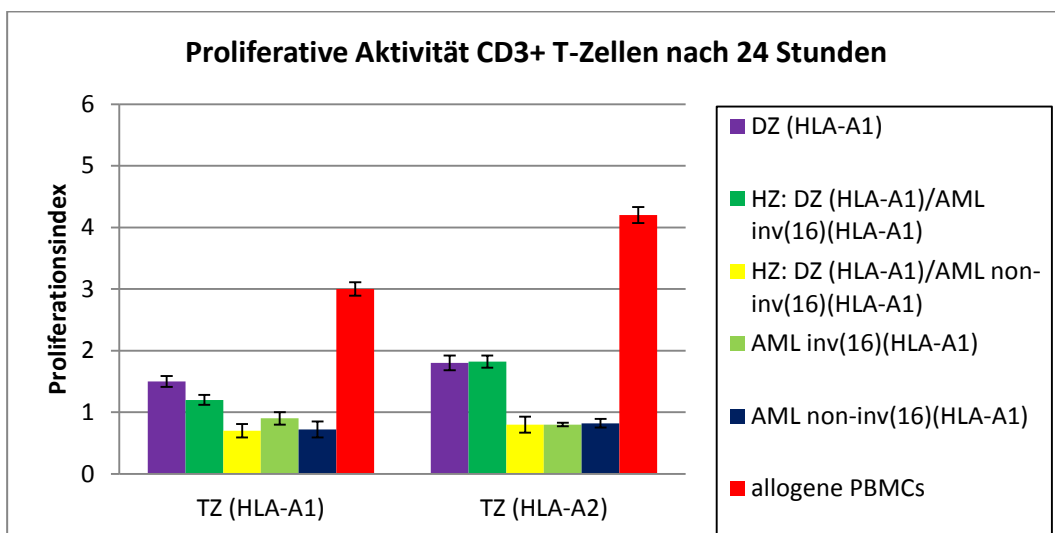


Abbildung 11: Proliferative Aktivität von TZ von AML inv(16)-Patienten als Reaktion auf verschiedene Stimulatorzellen. Als HZ dienten Fusionsprodukte aus diesen DZ eines AML inv(16)-Patienten und AML inv(16) positiven Zellen sowie AML inv(16) negativen Zellen. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

5.4 Heilungsversuch

Der Heilungsversuch wurde nach oben stehendem Schema (4.5.2) durchgeführt. Um nachzuweisen, dass die Vakzinierung mit HZ zu einer AML-Zellen-spezifischen Immunantwort führt, wurden in vitro Analysen mit aus Knochenmark gewonnenen T-Zellen sowohl vor als auch nach Vakzinierung durchgeführt.

5.4.1 Erster Heilungsversuch

Der erste Heilungsversuch erfolgte durch dreimaliges Vakzinieren in Dosen von $1-7 \times 10^6$ HZ innerhalb von 14 Tagen.

5.4.1.1 Proliferationstest vor Vakzinierung

24 Stunden vor der ersten Vakzinierung erfolgte ein Proliferationstest, bei dem die Stimulationsfähigkeit der HZ auf T-Zellen untersucht wurde. Diese wurde durchflusszytometrisch mit den AK CD3-FITC und CD8-FITC sowohl nach 24h als auch nach 48h der Kultur bestimmt.

5.4.1.1.1 Analyse der CD3-Expression

Nach 24h reagierten die T-Zellen der Patientin und die T-Zellen des gesunden Spenders mit einer starken proliferativen Reaktion auf die Stimulierung durch die allogenen PBMCs. Weder auf die Stimulierung durch die AML-Zellen noch auf die Stimulierung durch die autologen DZ zeigten die T-Zellen der Patientin eine proliferative Reaktion.

Die Spender-T-Zellen reagierten mit einer deutlichen Proliferation auf die Stimulierung durch die inv(16)-positiven Zellen, niedriger ausgeprägt auch auf die inv(16)-negativen AML-Zellen sowie auf die allogenen DZ.

Nach 24h der Stimulierung war der Anteil nicht-apoptotischer T-Zellen bei den Spender-T-Zellen höher als bei der T-Zellen der Patientin. Auffallend war, dass bei den T-Zellen der Patientin weitaus mehr apoptotische Zellen in der Reaktion auf die autologen AML-Zellen zu finden waren als bei der Reaktion auf die Kontrolltargets. In der Reaktion der T-Zellen der Patientin gegenüber den allogenen PBMCs fanden sich am wenigsten apoptotische Zellen (Abbildung 12).

Nach 48-stündiger Stimulierung war bei den T-Zellen der Patientin in der Reaktion auf die Stimulierung durch die autologen AML-Zellen eine geringe Proliferation der T-Zellen nachweisbar. Ein hoher Anteil dieser T-Zellen war zu diesem Zeitpunkt

apoptotisch. Gegenüber den autologen DZ sowie gegenüber den allogenen AML-Zellen war weiterhin keine proliferative Reaktion nachweisbar. Die proliferative Aktivität gegenüber den allogenen PBMCs hatte sich nach 48h gering gesteigert. In dieser Reaktion fand sich ein höherer Anteil nicht-apoptotischer Zellen.

Bei den Spender-T-Zellen fand sich eine anhaltende proliferative Reaktion auf alle drei Zelllinien mit einem erhöhten Anteil an apoptotischen Zellen gegenüber der Reaktion nach 24h (Abbildung 13).

Abb.: 12)

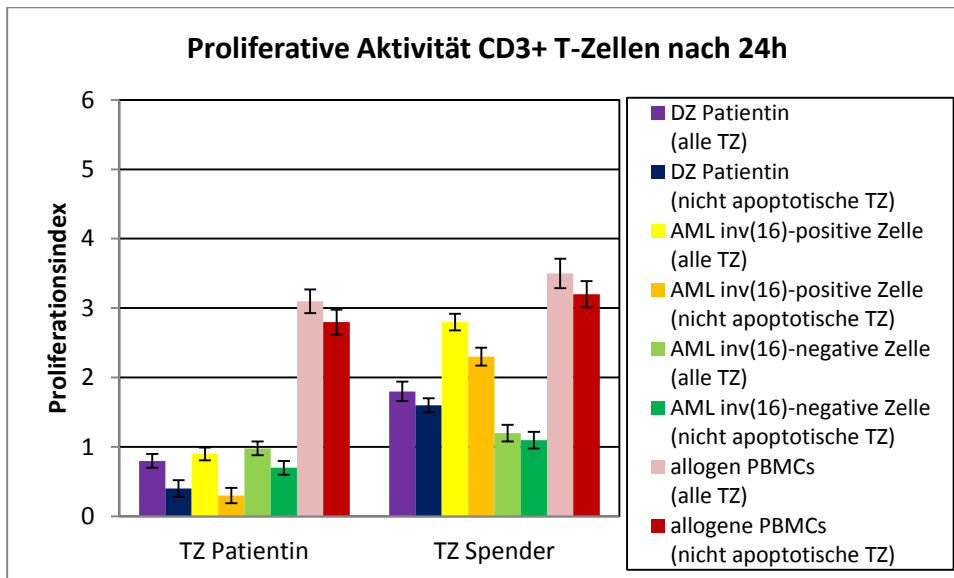


Abbildung 12: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen vor Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

Abb.: 13)

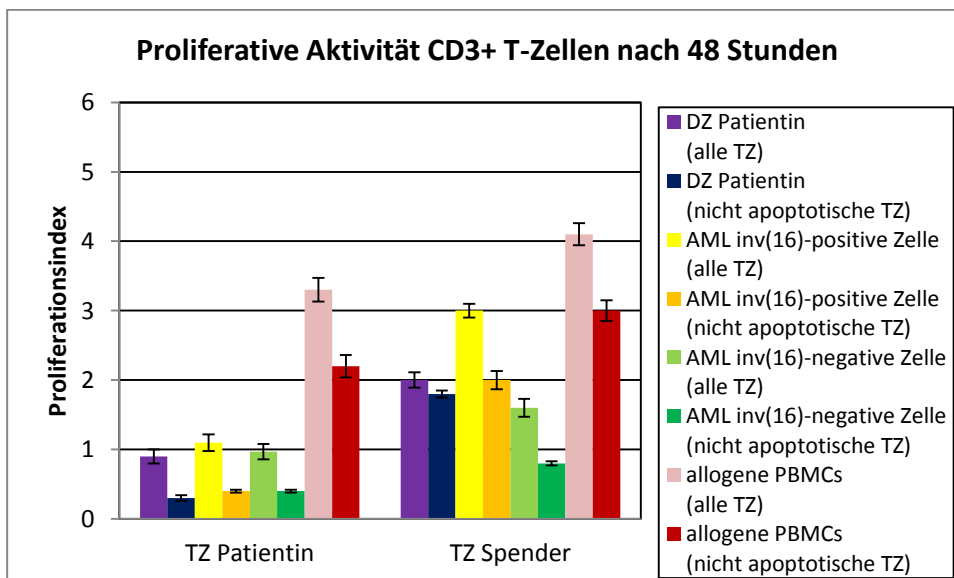


Abbildung 13: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen vor Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 48 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

5.4.1.1.2 Analyse der CD8-Expression

Nach 24h der Stimulation wiesen die T-Zellen der Patientin nur gegenüber den allogenen PBMCs eine proliferative Aktivität auf. Die Spender-T-Zellen hingegen reagierten auf alle Targets mit einer proliferativen Reaktion. Die Reaktion gegenüber den AML-Zellen war deutlich niedriger ausgeprägt als gegenüber den allogenen PBMCs (Abbildung 14).

Nach 48 stündiger Stimulierung konnte bei den T-Zellen der Patientin eine stärkere proliferative Aktivität gegenüber den Spender-PBMCs nachgewiesen werden. Auf die Stimulierung durch die anderen Targets zeigten sie weiterhin keine Reaktion. Die meisten Zellen waren apoptotisch. Bei den T-Zellen des Spenders fand sich eine anhaltende proliferative Aktivität gegenüber allen Targets. Die stärkste Reaktion fand sich gegenüber den allogenen Spender-PBMCs (Abbildung 15).

Abb.: 14)

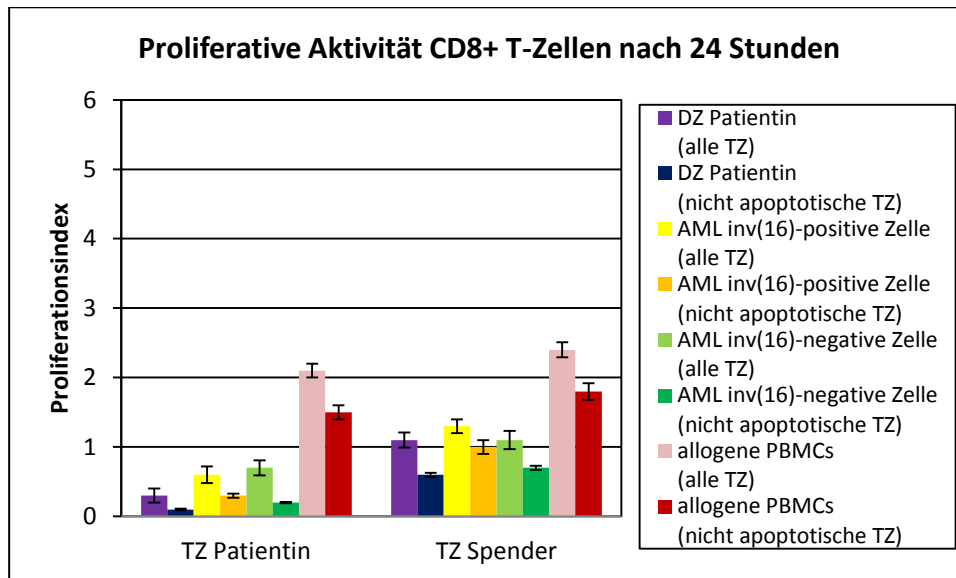


Abbildung 14: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen vor Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD8-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

Abb.: 15)

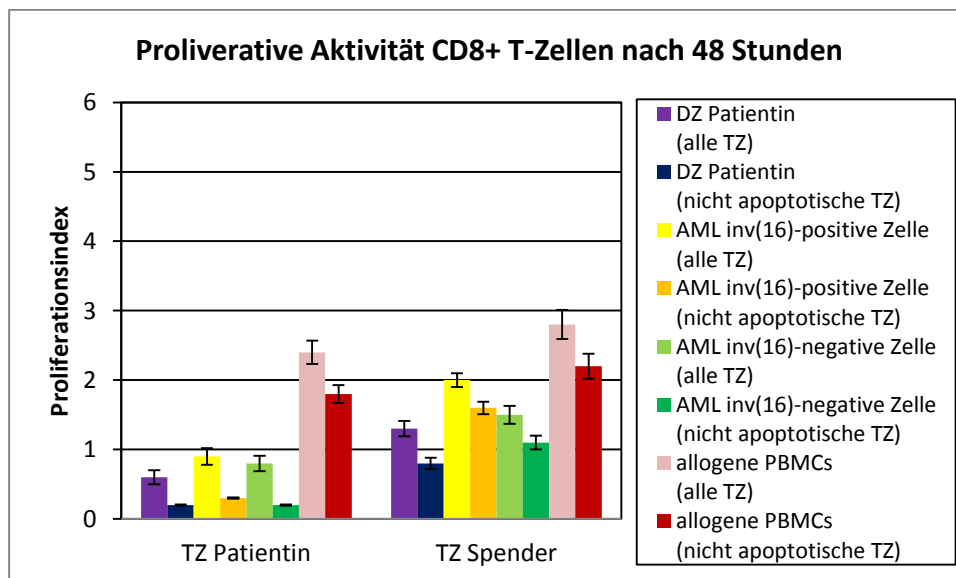


Abbildung 15: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen vor Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD8-Expression nach einer Stimulation von 48 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

5.4.1.2 Proliferationstest nach Vakzinierung

An Tag 5 nach der letzten erfolgten Vakzinierung wurde erneut ein Proliferationstest nach oben beschriebenem Muster durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich die T-Zell-Antwort der Patienten nach der Vakzinierung auf die Stimulation durch die unterschiedlichen Targetzellen veränderte.

5.4.1.2.1 Analyse der CD3-Expression nach 24h

Die CD3-positiven T-Zellen der Patientin zeigten eine proliferative Reaktion gegenüber den AML-Zellen. Diese war gegenüber den autologen AML-Zellen stärker ausgeprägt als gegenüber den inv(16)-negativen AML-Zellen.

Am stärksten reagierten die T-Zellen der Patientin auf die Stimulierung durch die allogenen PBMCs. Die Reaktion auf alle Targetzellen war deutlich stärker ausgeprägt als im Proliferationstest vor der Vakzinierung. Es fanden sich nur in der Reaktion gegenüber den autologen AML-Zellen und den PBMCs nicht-apoptotische Zellen.

Die Spender-T-Zellen zeigten eine vergleichbare Reaktion wie vor der Vakzinierung.

Weiterhin reagierten diese T-Zellen deutlich stärker mit einer Proliferation gegenüber allen Targets als die T-Zellen der Patientin. Der Unterschied der proliferativen Aktivität der Spender-T-Zellen zu den T-Zellen der Patientin war jedoch geringer ausgeprägt als vor der Vakzinierung (Abbildung 16).

Nach 48-stündiger Stimulation proliferierten die CD3-positiven T-Zellen der Patientin in der Reaktion auf die autologen AML-Zellen erstmals stärker als die T-Zellen des Spenders.

In den Reaktionen auf die anderen Targetzellen war die proliferative Aktivität weiterhin auf der Seite der T-Zellen des Spenders stärker ausgeprägt. Weiterhin fand sich die stärkste Reaktion auf die Stimulierung durch die allogenen PBMCs. Ein großer Anteil der T-Zellen der Patientin war zu diesem Zeitpunkt apoptotisch. In der Reaktion auf die autologen AML-Zellen waren doppelt so viele nicht-apoptotische Zellen zu finden wie in den Reaktionen gegenüber den allogenen AML-Zellen.

Die Spender-T-Zellen zeigten nach 48 Stunden eine vergleichbare Reaktion wie vor der Vakzinierung (Abbildung 17).

Abb.: 16)

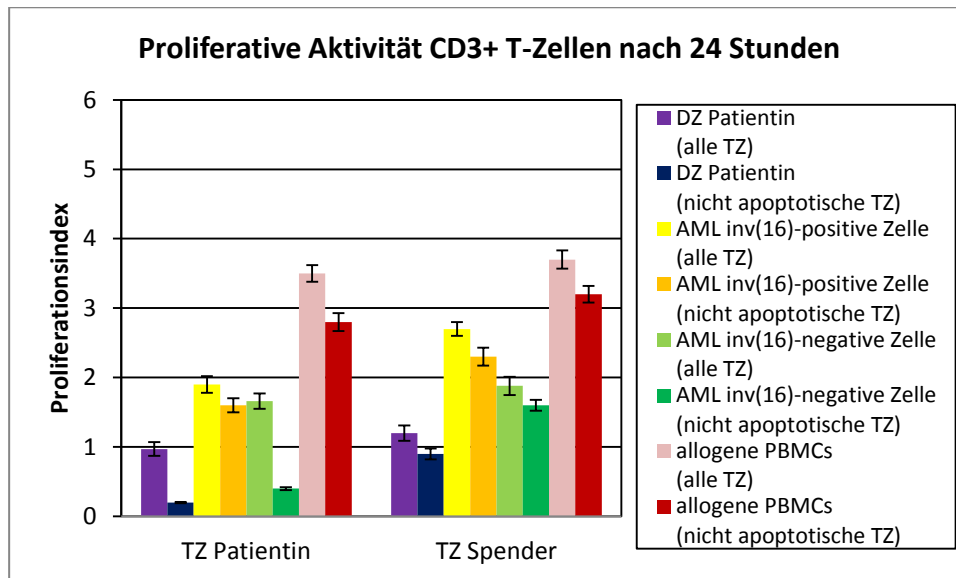


Abbildung 16: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen nach Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

Abb.: 17)

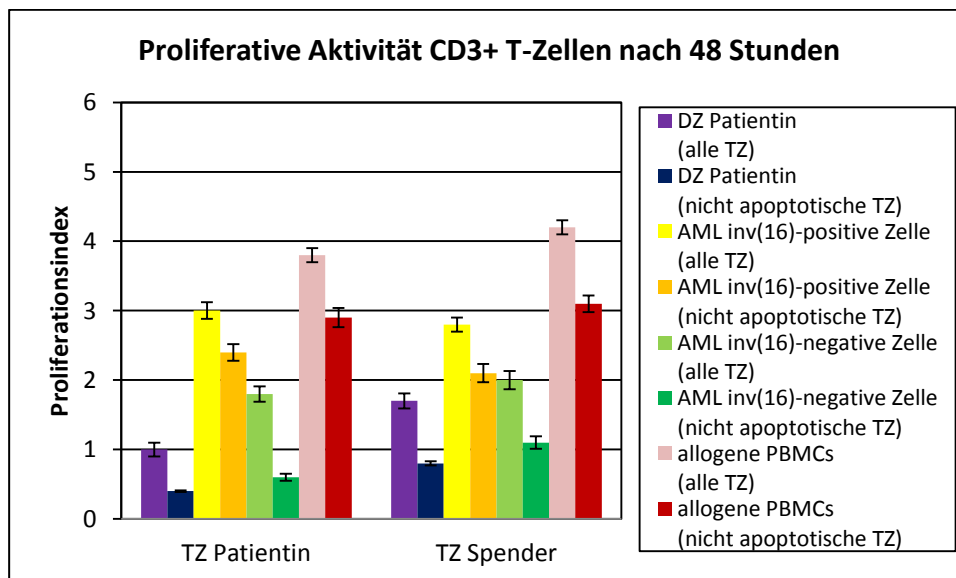


Abbildung 17: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen nach Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 48 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

5.4.1.2.2 Analyse der CD8-Expression

Die T-Zellen der Patientin zeigten eine proliferative Reaktion gegenüber allen Targetzellen, außer den autologen DZ. Die T-Zellen der Patientin proliferierten gegenüber den AML inv(16)-Zellen stärker als die T-Zellen des Spenders. Im Unterschied zum Proliferationstest vor Vakzinierung waren die meisten der T-Zellen der Patientin zu diesem Zeitpunkt nicht apoptotisch. In der Reaktion auf die autologen AML-Zellen waren deutlich mehr nicht-apoptotische Zellen zu finden als in den Reaktionen gegenüber den DZ und den allogenen AML-Zellen. Die Spender-T-Zellen zeigten eine vergleichbare Reaktion wie vor der Vakzinierung (Abbildung 18).

Nach 48-stündiger Stimulierung war die proliferative Aktivität bei den T-Zellen der Patientin gegenüber allen Targetzellen weiter angestiegen.

Bei den Spender-T-Zellen zeigten sich ähnliche Verhältnisse wie vor der Vakzinierung (Abbildung 19).

Abb.: 18)

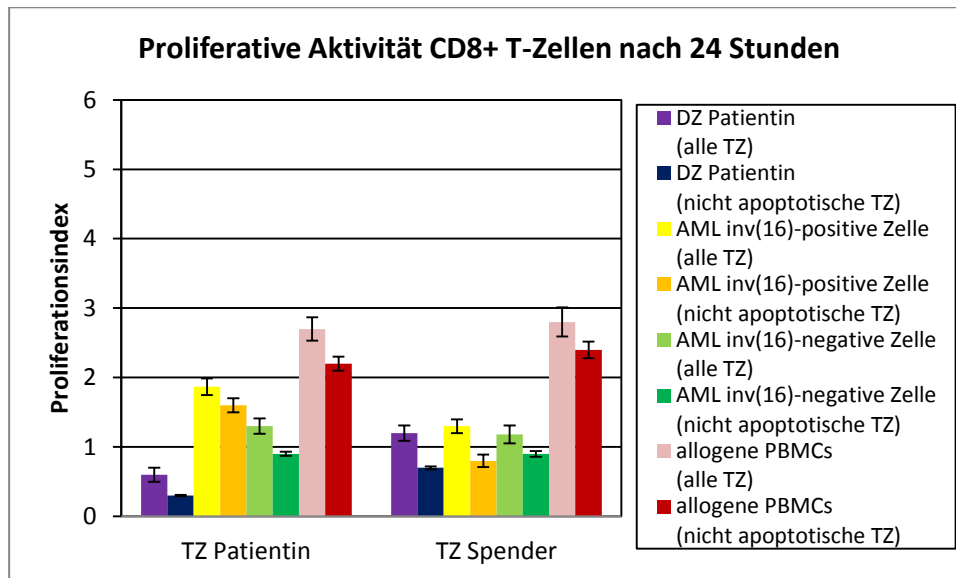


Abbildung 18: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen nach Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD8-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

Abb.: 19)

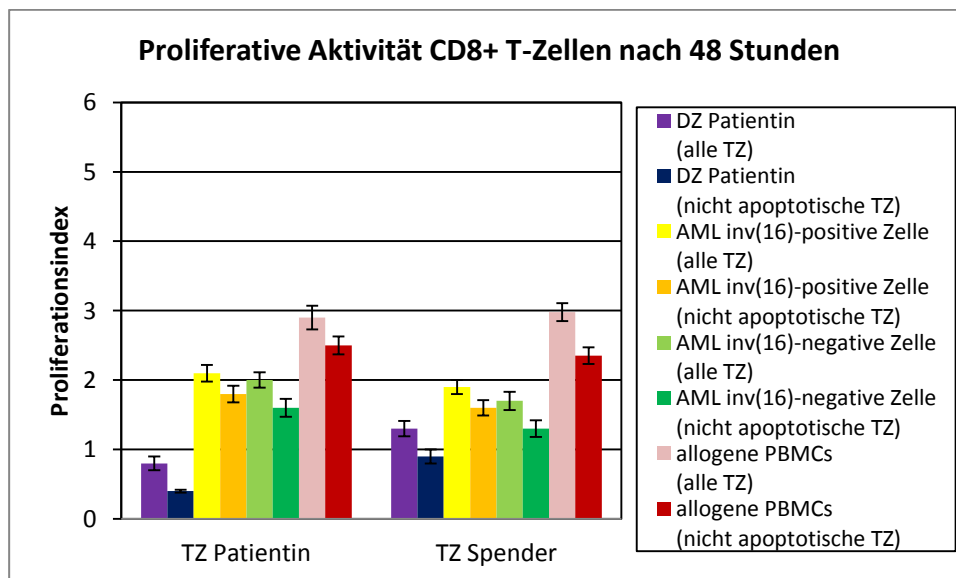


Abbildung 19: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen nach Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD8-Expression nach einer Stimulation von 48 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

5.4.2 Zweiter Heilungsversuch

Als Konsequenz der Ergebnisse des ersten Heilungsversuches wurde ein zweiter Heilungsversuch, nach einem zeitlichen Abstand von 4 Monaten zum ersten Heilungsversuch, mit einer erhöhten Dosis der Vakzine in erhöhter Frequenz durchgeführt.

Es erfolgte eine fünfmalige Vakzinierung in Dosen von $10\text{-}15 \times 10^6$ HZ innerhalb von 9 Tagen. Sowohl vor der Vakzinierung als auch danach wurden wie im ersten Heilungsversuch Proliferationstests durchgeführt. Um einen evtl. entstandenen Langzeiteffekt zu untersuchen, wurde ein Proliferationstest 40 Tage nach der letzten Vakzine durchgeführt.

5.4.2.1 Proliferation vor Vakzinierung

24 Stunden vor der ersten Vakzinierung im Rahmen des zweiten Heilungsversuches erfolgte ein Proliferationstest, bei dem die Stimulationsfähigkeit der oben beschriebenen Targetzellen auf die T-Zellen untersucht wurde. Die Reaktionsfähigkeit wurde durchflusszytometrisch mit den AK CD3-FITC und CD8-FITC sowohl nach 24h als auch nach 48h der Kultur bestimmt.

5.4.2.1.1 Analyse der CD3-Expression

Nach 24h der Kultur reagierten die T-Zellen der Patientin auf die Stimulierung durch die allogenen AML-Zellen mit einer geringen Proliferation. Eine stärkere proliferative Aktivität zeigte sich nur auf die Stimulierung durch die Spender-PBMCs. Auf die Stimulierung durch die autologen AML-Zellen sowie auf die autologen DZ zeigten sie keine Reaktion. Erneut waren bei den T-Zellen der Patientin weitaus mehr apoptotische Zellen in der Reaktion auf die autologen AML-Zellen zu finden als bei der Reaktion auf die Kontrolltargets.

Die Spender-T-Zellen zeigten eine deutliche Reaktion auf die Stimulierung durch die Targetzellen. Auch hier fand sich die stärkste Reaktion auf die Stimulierung durch die allogenen PBMCs. Unabhängig vom Stimulus proliferierten die Spender-T-Zellen stärker als die T-Zellen der Patientin. Nach 24h der Stimulierung war der Anteil nicht-apoptotischer T-Zellen bei den Spender-T-Zellen deutlich höher als bei den T-Zellen der Patientin (Abbildung 20).

Nach 48h der Stimulierung war eine Proliferation der T-Zellen der Patientin als

Reaktion auf die AML-Zellen messbar, auch auf die autologen AML-Blasten. Die stärkste Proliferation fand sich als Reaktion auf die allogenen PBMCs. Ein wesentlicher Anteil der T-Zellen war apoptotisch. Auf die Stimulierung durch DZ wurde keine Reaktion beobachtet.

Die Spender-T-Zellen zeigten eine konstante starke Proliferation als Reaktion auf alle Targets. Es fanden sich in allen Reaktionen deutlich weniger apoptotische Zellen als in der Reaktionen der T-Zellen der Patientin (Abbildung 21).

Abb.: 20)

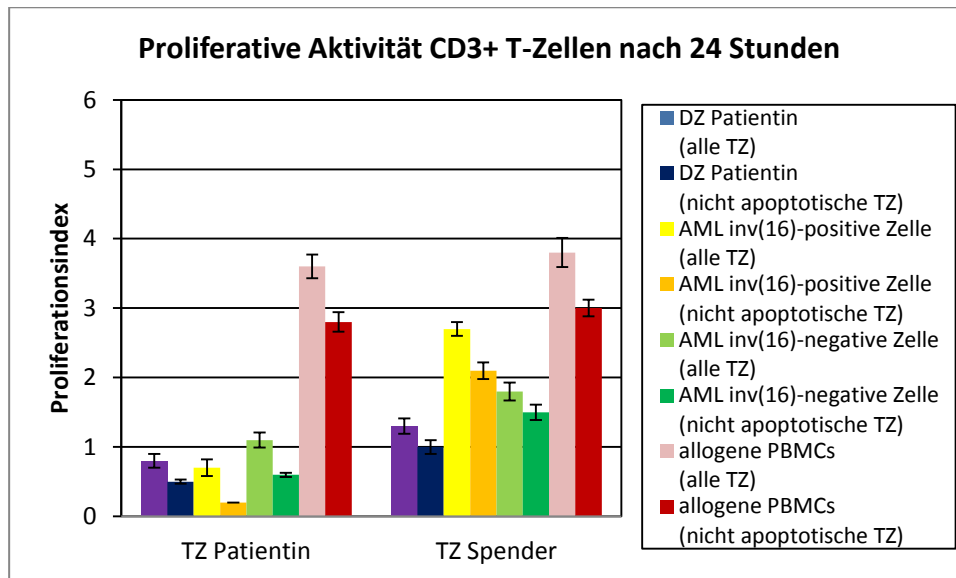


Abbildung 20: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen vor Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

Abb.: 21)

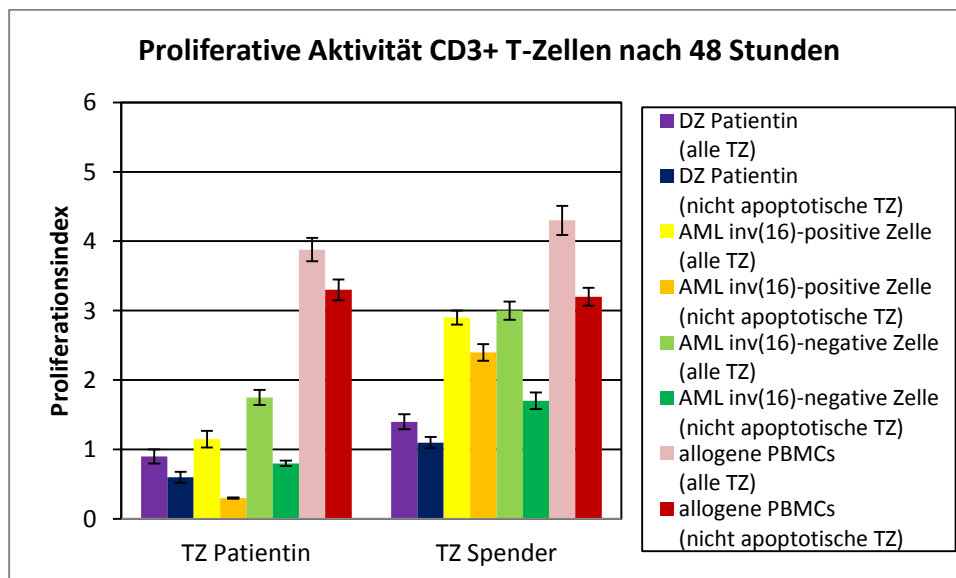


Abbildung 21: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen vor Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 48 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

5.4.2.1.2 Analyse der CD8-Expression

Die T-Zellen der Patientin zeigten nach 24h nur auf die Stimulierung durch die Spender-PBMCs eine proliferative Reaktion. Das Verhältnis der CD8-Expression der T-Zellen der Patientin zur CD8-Expression der T-Zellen des Spenders lag deutlich auf Seiten der Spender-T-Zellen. Die Spender-T-Zellen reagierten in ähnlicher Höhe wie beim ersten Heilungsversuch auf alle Targets.

(Abbildung 22).

Nach 48 stündiger Stimulierung zeigte sich bei den T-Zellen der Patientin weiterhin nur in der Reaktion auf die Stimulierung durch die allogenen PBMCs eine proliferative Reaktion. In den Reaktionen gegenüber den anderen Targets waren fast alle Zellen apoptotisch.

Bei den T-Zellen des Spenders fand sich eine anhaltende proliferative Aktivität gegenüber allen Targets mit einem erhöhten Anteil an apoptotischen Zellen (Abbildung 23).

Abb.: 22)

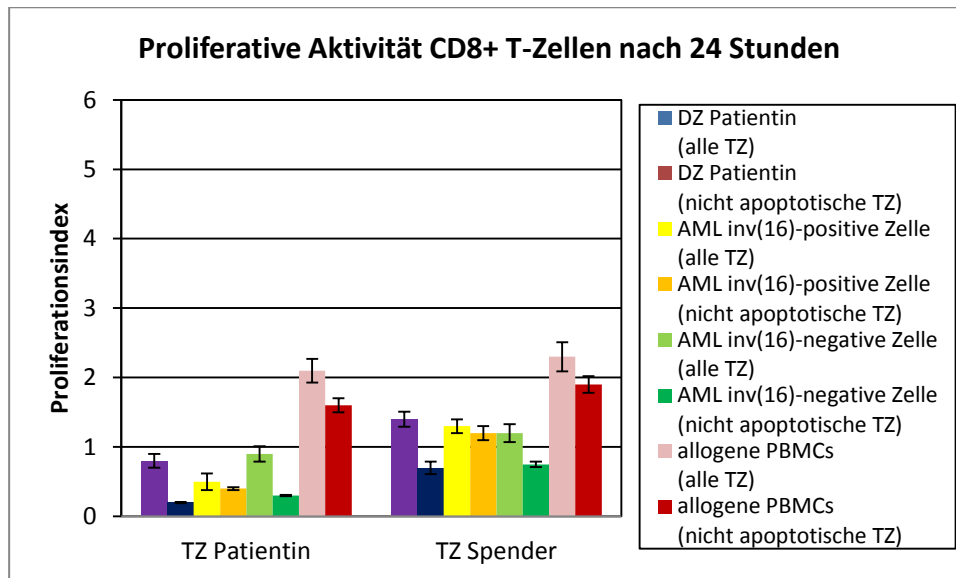


Abbildung 22: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen vor Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD8-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

Abb.: 23)

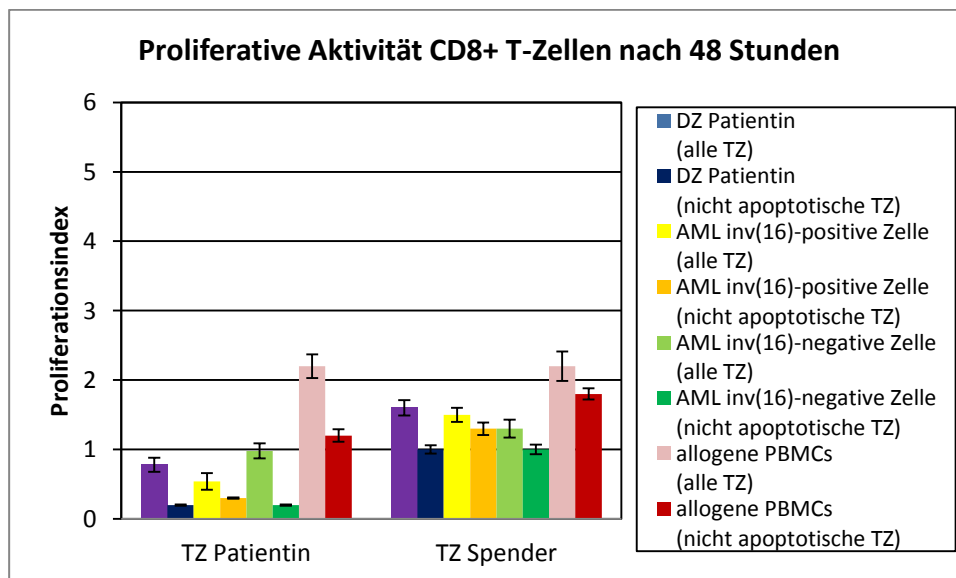


Abbildung 23: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen vor Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD8-Expression nach einer Stimulation von 48 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

5.4.2.2 Proliferationstests nach Vakzinierung

An Tag fünf nach letzter erfolgter Vakzinierung wurde erneut ein Proliferationstest nach oben beschriebenem Muster durchgeführt, um eine Änderung der T-Zell-Antwort auf die Stimulierung durch autologe AML-Zellen zu untersuchen.

5.4.2.2.1 Analyse der CD3-Expression

Nach 24h der Kultur zeigten die T-Zellen der Patientin eine Reaktion auf die Stimulation durch alle Targets, außer gegenüber den autologen DZ. In der Reaktion auf die Stimulierung durch die allogenen PBMCs zeigten die T-Zellen der Patientin die stärkste Reaktion. Den größten Zuwachs der proliferativen Aktivität zeigten die T-Zellen in der Reaktion auf die Stimulierung durch die autologen AML-Zellen. In dieser Reaktion fanden sich keine apoptotischen Zellen. Das Proliferationsverhältnis der T-Zellen der Patientin zu den T-Zellen des Spenders lag hier auf Seiten der T-Zellen der Patientin.

Die Spender-T-Zellen zeigten eine vergleichbare Reaktion wie vor der Vakzinierung und wie im ersten Heilungsversuch (Abbildung 24).

Nach 48-stündiger Stimulation, lag das Proliferationsverhältnis in der Reaktion auf die autologen AML-Zellen deutlich ausgeprägter auf Seiten der T-Zellen der Patientin als nach 24h der Stimulierung. Hier waren fast ausschließlich nicht-apoptotische Zellen zu finden.

In den Reaktionen auf die Kontrolltargets reagierten die Spender-T-Zellen stärker als die T-Zellen der Patientin. Die meisten T-Zellen der Patientin waren in diesen Reaktionen apoptotisch.

Die Spender-T-Zellen zeigten eine vergleichbare Reaktion wie vor der Vakzinierung (Abbildung 25).

Abb.: 24)

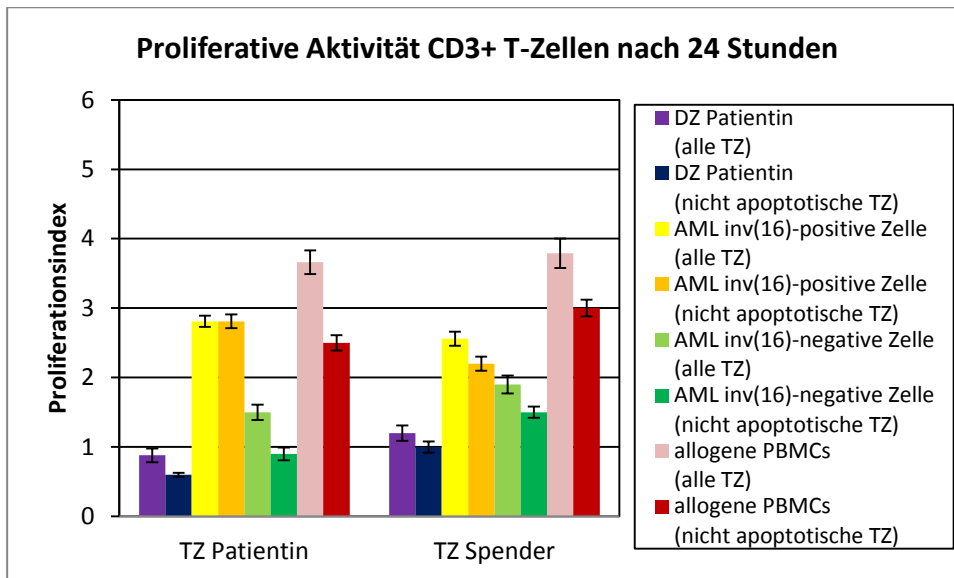


Abbildung 24: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen nach Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

Abb.: 25)

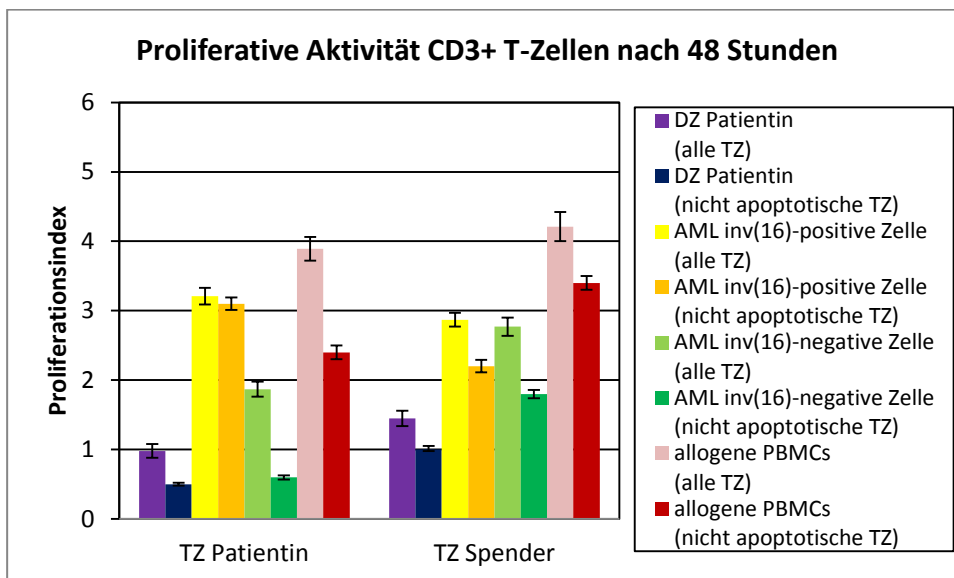


Abbildung 25: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen nach Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 48 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

5.4.2.2.2 Analyse der CD8-Expression

Die T-Zellen der Patientin zeigten nach 24h der Kultur eine Reaktion gegenüber allen Targetzellen, deutlich am stärksten ausgeprägt in der Reaktion auf die Stimulierung durch die autologen AML-Zellen. Das Proliferationsverhältnis lag in der Reaktion auf die autologen AML-Zellen deutlich auf der Seite der T-Zellen der Patientin und war wesentlich höher ausgeprägt als in allen Reaktionen zuvor. Hier waren ausschließlich nicht-apoptotische Zellen zu finden.

In den Reaktionen auf die Kontrolltargets reagierten die T-Zellen der Patientin etwas stärker als vor der Vakzinierung. Das Proliferationsverhältnis lag, außer in der Reaktion auf die autologen DZ, auf Seiten der T-Zellen der Patientin. Die meisten T-Zellen der Patientin waren in diesen Reaktionen apoptotisch.

Die Spender-T-Zellen zeigten eine vergleichbare Reaktion wie vor der Vakzinierung (Abbildung 26).

Nach 48-stündiger Stimulierung war eine deutliche proliferative Aktivität bei den T-Zellen der Patientin auf die Stimulierung durch alle Targets nachweisbar. Die Proliferation war am stärksten in der Reaktion auf die Stimulierung durch die autologen AML-Zellen angestiegen. Die proliferative Aktivität war hier wesentlich stärker ausgeprägt als im Proliferationstest vor der Vakzinierung des zweiten Heilungsversuches und nach der Vakzinierung des ersten Heilungsversuches.

Alle sichtbaren CD8-positiven Zellen waren in dieser Reaktion nicht apoptotisch. In den Reaktionen auf die Stimulierung durch die Kontrolltargets lag das proliferative Verhältnis wie vor der Vakzinierung auf der Seite der Spender-T-Zellen.

Die Spender-T-Zellen zeigten nach der Vakzinierung keine signifikante Änderung der Reagibilität (Abbildung 27).

Abb.: 26)

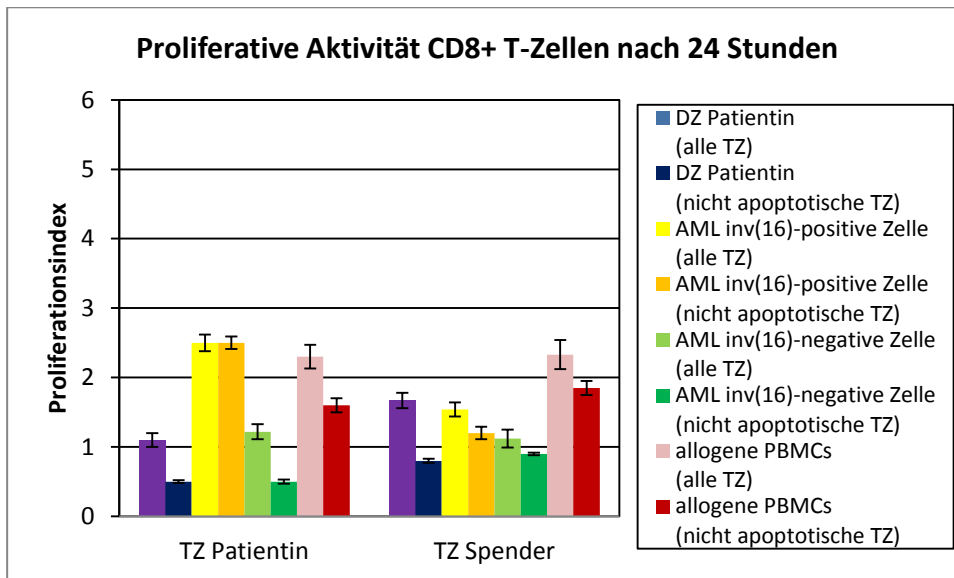


Abbildung 26: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen nach Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD8-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

Abb.: 27)

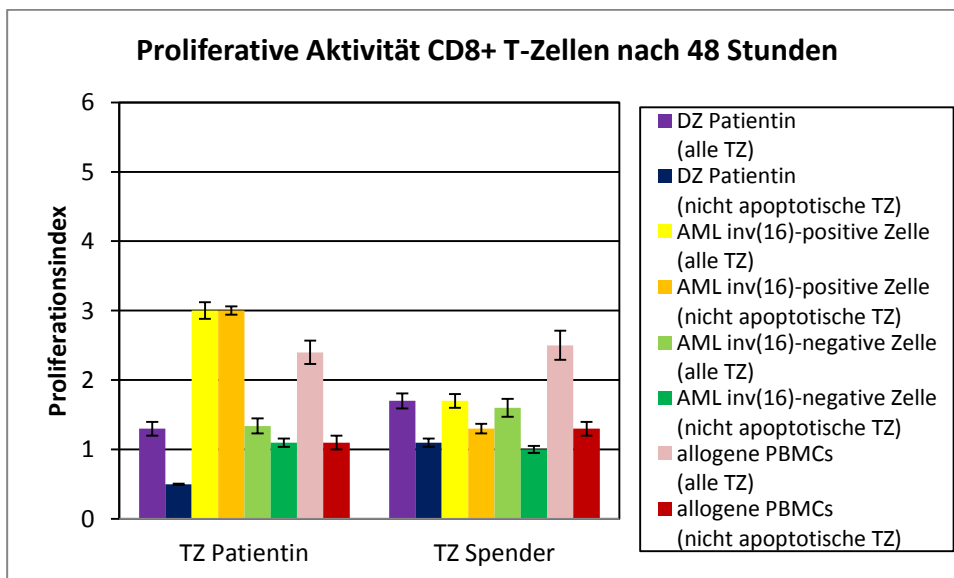


Abbildung 27: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen nach Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD8-Expression nach einer Stimulation von 48 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

5.4.3 Proliferationstest 40 Tage nach Vakzinierung

An Tag 40 nach der letzten erfolgten Vakzinierung wurde erneut ein Proliferationstest nach oben beschriebenem Muster durchgeführt, um zu untersuchen, ob weiterhin eine T-Zell-Antwort gegen autologe AML-Zellen ausgelöst werden konnte.

5.4.3.1 Analyse der CD3-Expression

Die TZ der Patientin zeigten nach 24h der Kultur eine deutliche Reaktion auf die Stimulierung durch autologe AML-Zellen, hier lag das Proliferationsverhältnis der T-Zellen auf Seiten der T-Zellen der Patientin. Auch auf die Stimulierung durch die allogenen AML-Zellen reagierten die T-Zellen mit einer Proliferation. Diese Reaktionen waren aber nicht so ausgeprägt wie die Reaktion auf die Stimulierung durch die autologen AML-Zellen und niedriger als die Reaktionen der Spender-T-Zellen auf die Stimulierung durch diese Targets. Ebenso waren sie niedriger als im Proliferationstest, der 10 Tage nach Vakzinierung durchgeführt wurde. Nur in der Reaktion auf die autologen AML-Zellen fanden sich keine apoptotische Zellen. Die Spender-T-Zellen zeigten eine vergleichbare Reaktion wie vor der Vakzinierung (Abbildung 28).

Nach 48-stündiger Stimulation lag das Proliferationsverhältnis in der Reaktion auf die autologen AML-Zellen deutlicher auf Seiten der T-Zellen der Patientin als in der Reaktion nach 24h. Hier waren nur wenige apoptotische Zellen messbar. In den Reaktionen auf die Kontrolltargets lag das Proliferationsverhältnis der T-Zellen auf der Seite der Spender-T-Zellen. Die meisten T-Zellen der Patientin waren in diesen Reaktionen apoptotisch.

Die Spender-T-Zellen zeigten eine vergleichbare Reaktion wie vor der Vakzinierung (Abbildung 29).

Abb.: 28)

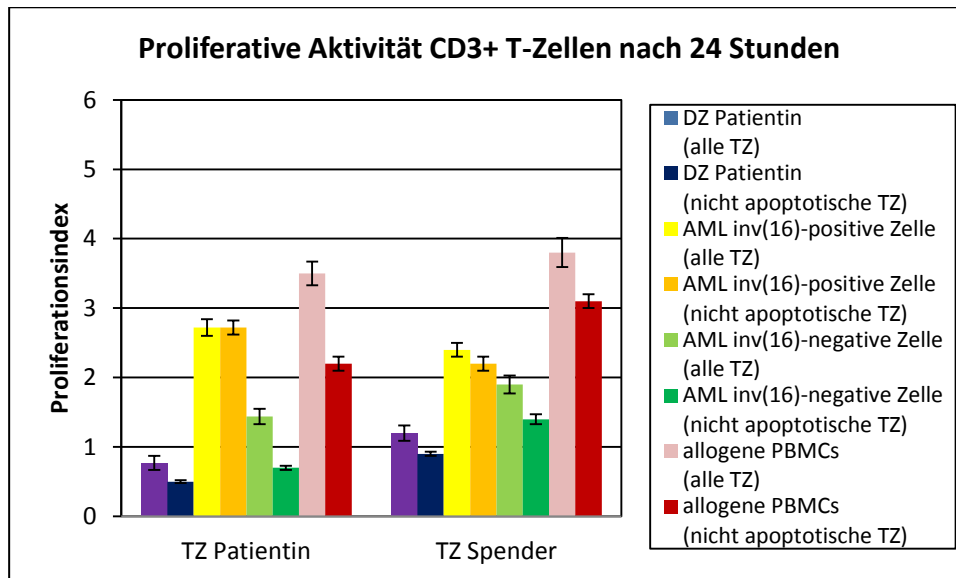


Abbildung 28: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene Stimulatorzellen 40 Tage nach Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

Abb.: 29)

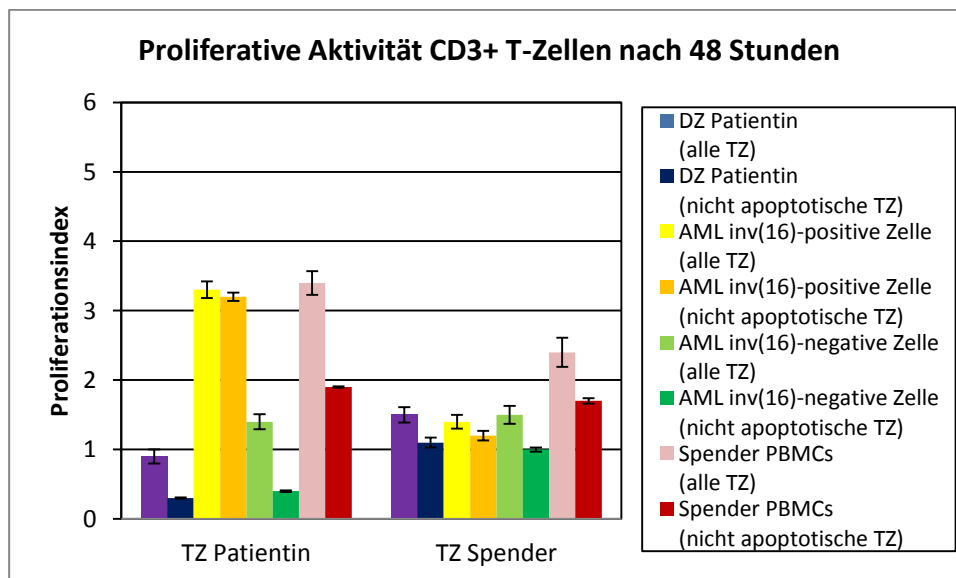


Abbildung 29: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene Stimulatorzellen 40 Tage nach Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD3-Expression nach einer Stimulation von 48 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

5.4.3.2 Analyse der CD8-Expression

Nach 24h zeigten die T-Zellen der Patientin eine Reaktion gegenüber allen Targets, besonders ausgeprägt in der Reaktion auf die Stimulierung durch die autologen AML-Zellen. Das Verhältnis der T-Zellen lag in dieser Reaktion deutlich bei den T-Zellen der Patientin, ausgeprägter als in den vorherigen Reaktionen. Hier waren fast nur nicht-apoptotische Zellen zu finden. Ebenso proliferierten die T-Zellen der Patientin auf die Stimulation mit den allogenen PBMCs fast ebenso stark wie die T-Zellen des Spenders. Die Hälfte der T-Zellen der Patientin waren in diesen Reaktionen apoptotisch.

Die Spender-T-Zellen zeigten eine vergleichbare Reaktion wie vor der Vakzinierung (Abbildung 30).

Nach 48-stündiger Stimulierung war eine anhaltende proliferative Aktivität bei den T-Zellen der Patientin gegenüber allen Targets nachweisbar. Die Verhältnisse waren ähnlich wie bei der Proliferation nach 24h. Die Reaktion gegenüber den autologen AML-Zellen war bei den T-Zellen der Patientin deutlich stärker als bei den T-Zellen des Spenders. Apoptotische T-Zellen der Patientin waren in dieser Reaktion nicht messbar. Die Spender-T-Zellen zeigten eine vergleichbare Reaktion wie vor der Vakzinierung (Abbildung 31).

Abb.: 30)

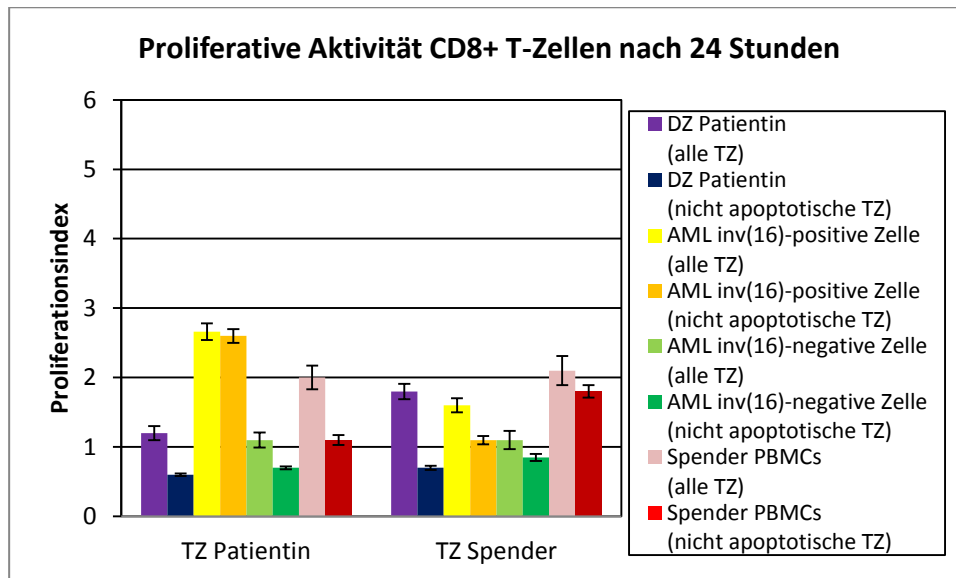


Abbildung 30: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene Stimulatorzellen 40 Tage nach Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD8-Expression nach einer Stimulation von 24 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

Abb.: 31)

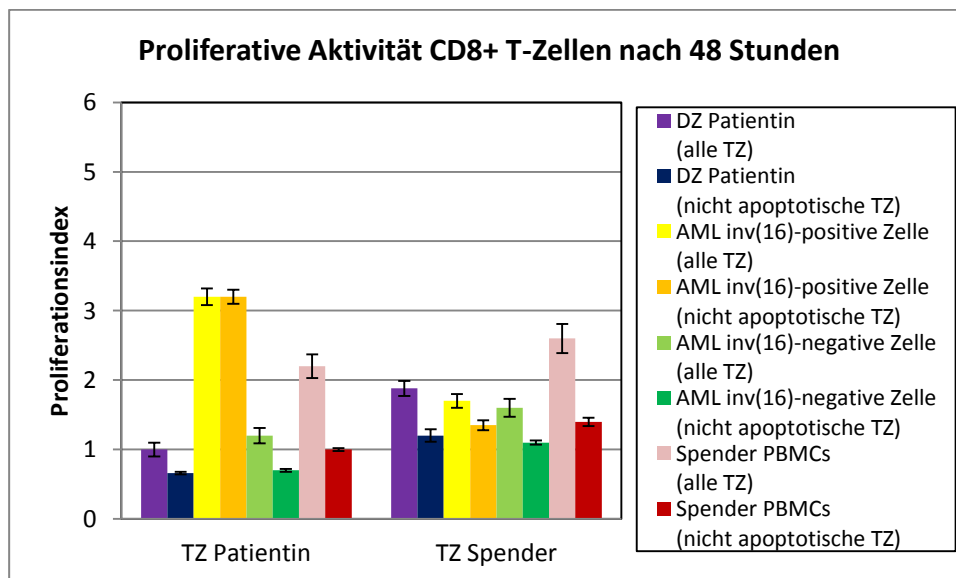


Abbildung 31: Proliferative Aktivität von TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene Stimulatorzellen 40 Tage nach Vakzinierung. Die proliferative Aktivität wurde als Mittelwert aus drei Kulturansätzen durchflusszytometrisch anhand des Zuwachses der CD8-Expression nach einer Stimulation von 48 h bestimmt und als Proliferationsindex (Aktivität des Testwells/Aktivität der Kontrolle ohne spezifischen Stimulus) \pm Standardabweichung dargestellt.

6 Diskussion

6.1 Allgemeines

Die Prognose einer AML-Erkrankung ist schlecht, die 5-Jahres-Überlebensrate aller AML-Patienten liegt zwischen 20-40% (116). Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die zuvor beschriebene Beobachtung einer günstigeren Prognose der inv(16)-positiven AML, im Vergleich zu inv(16)-negativen Erkrankungen (74, 72, 19). Jedoch ist auch bei der inv(16)-positiven AML die Haupttodesursache das auf dem Boden einer minimalen Resterkrankung entstehende Rezidiv.

Sowohl die Chemotherapie als auch die allogene Transplantation sind mit schweren Einschränkungen für den Patienten verbunden. Als Therapie sind sie nicht für jeden Patienten geeignet und in vielen Fällen auch nicht ausreichend. Diese Problematik führte dazu, dass die Immunologie als unterstützender Therapiearm, insbesondere zur Therapie der MRD, in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung rückte.

6.2 Die AML-Zelle

Den eindrucksvollsten Beweis für die Fähigkeit des Immunsystems, Leukämiezellen eliminieren zu können, liefert die allogene Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation, bei der sowohl T-Zellen als auch NK-Zellen in den Spender-versus-Leukämie Effekt involviert sind (8). Seit vielen Jahren ist bekannt, dass nicht nur zwischen allogenen, sondern auch zwischen autologen T-Zellen und Leukämiezellen zytotoxische Interaktionen bestehen können (80).

Im Rahmen präklinischer Untersuchungen in unserem Labor wurden sowohl inv(16)-positive AML-Zellen als auch inv(16)-negative AML-Zellen ohne Zusatz von Zytokinen gemeinsam mit autologen T-Zellen kultiviert. Die AML-Blasten verloren ihre Vorläufermarker CD33, CD13 und CD34, während die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 signifikant anstieg. Es zeigte sich jedoch keine Entwicklung der AML-Zellen zu Dendriten ähnlichen Zellen, da die dendritischen Oberflächenmarker CD209 und CD1a nicht nachgewiesen werden konnten. Die Blasten induzierten eine Aktivierung der T-Zellen. Eine signifikante Proliferation der T-Zellen konnte aber nur in der Kultur mit inv(16)-positiven AML-Zellen beobachtet werden. In den Kulturen der anderen Karyotypen zeigte sich ein Anstieg der Oberflächenmarker

CD25 und CD69 im Sinne einer allgemeinen Aktivierung. Oligoklonal expandierte T-Zellen waren in der Lage, inv(16)-positive Blasten zu lysieren (7).

Die oben beschriebenen Ergebnisse legen nahe, dass das Fusionsprodukt CBF β /MYH11 die Ausbildung eines antigenen Epitops bewirken könnte. Ebenfalls wird deutlich, dass leukämische Blasten die Fähigkeit besitzen tumorassoziierte Antigene MHC restringiert zu präsentieren. Trotz der Expression von MHC-Klasse I- und II-Molekülen sind leukämische Blasten jedoch keine potenten antigenpräsentierenden Zellen.

6.3 Immuntherapeutische Ansätze

Für eine effektive Immunantwort durch T-Lymphozyten wird neben der reinen Antigenexpression auch die Bindung von kostimulatorischen Molekülen zwischen antigenpräsentierenden Zellen und Lymphozyten benötigt. So wurde gezeigt, dass die Stimulation von autologen mononukleären Zellen mit AML-Zellen, die durch genetische Veränderungen die kostimulatorischen Marker CD80 und IL-2 präsentieren, zur lytischen Kompetenz gegenüber nicht veränderten AML-Zellen führt (46).

Der klassische immuntherapeutische Ansatz basiert auf der Identifizierung von tumorassoziierten Antigenen. PRAME, der Rezeptor für Hyaluronsäure vermittelte Motilität und das M-Phase Phosphorprotein sind durch serologische Screenings bei AML-Patienten als leukämieassoziierte Antigene identifiziert worden und könnten ein mögliches Ziel für eine Immunantwort darstellen (39, 40).

Auch die in Leukämiezellen überexprimierten normalen Proteine wie Wilmstumor 1- (WT1) Protein, Proteinase 3 (PR3) und humane Telomerase reverse Transkriptase haben schon AML-spezifische zytotoxische T-Zell-Antworten hervorgerufen (67).

Wir vermuten, dass ebenfalls das fusionierte Protein CBF β /MYH11 eine molekulare Basis für die Expression von leukämie-spezifischen Hybridpeptiden formt und eine T-Zell-Reaktivität auslösen könnte.

Im Prinzip können immuntherapeutische Ansätze gegen alle Antigene klonaler Tumorzellen gerichtet sein.

Der adoptive Transfer von T-Zellen beinhaltet den Transfer von Lymphozyten, die ex vivo generiert und mit direkter Antitumorreaktivität ausgestattet wurden. Im Rahmen eines Rezidivs nach allogener Transplantation werden T-Zellen des ursprünglichen Stammzellspenders seit den 90er Jahren eingesetzt (83).

T-Zellen mit spezifischer Aktivität gegen Leukämie assoziierte Antigene können

entweder in vitro, durch den Gebrauch von antigenpräsentierenden Zellen, die zuvor mit LAA beladen wurden, generiert werden oder aus dem Blut von Leukämiepatienten gewonnen werden (1).

Auch die Kombination von transferierten T-Zellen zusammen mit hochpotenten AK stellt eine Therapieoption dar. In einem Mausmodell eines fortgeschrittenen Melanoms konnte gezeigt werden, dass der Transfer einer kleinen Anzahl von naiven Tumorreaktiven CD4-positiven T-Zellen in lymphopene Empfänger eine substantielle T-Zell-Expansion, Differenzierung und Regression des Tumors auslöst. Die CD4-positiven T-Zellen entwickelten eine zytotoxische Aktivität gegenüber den Tumorzellen. Dieser Effekt konnte durch die Blockade des koinhibitorischen Rezeptors, zytotoxisches T-Zell-assoziiertes Antigen 4 (ZTLA-4), noch verstärkt werden (86).

Der Vorteil des adoptiven T-Zell-Transfers liegt darin, dass auch immunsupprimierte Patienten behandelt werden können. Die Schwierigkeiten des adoptiven T-Zell-Transfers liegen in der Generation einer suffizienten Anzahl von hoch aviden LAA-spezifischen T-Zellen. Ebenfalls fehlt den T-Zellen die Fähigkeit zur Migration und Persistenz in vivo.

Ein weiterer interessanter, und auch bereits in mehreren Studien untersuchter Ansatz, ist die Gabe von Interleukin-2. IL-2 ist für die Stimulation und Proliferation von T- und NK-Zellen verantwortlich. Es wurde gezeigt, dass die Gabe von hochdosiertem IL-2 bei Patienten mit einem Rezidiv der Erkrankung zu einem signifikanten Anstieg von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen führte. Jedoch ist die Gabe von IL-2 auch mit ernstzunehmenden unerwünschten Nebenwirkungen wie einer Thrombozytopenie verbunden. Langzeitdaten in Bezug auf das Outcome der Patienten hängen stark davon ab, welche Untergruppe von AML-Patienten untersucht wurde und welches therapeutische Regime mit IL-2 kombiniert wurde (5, 61).

Ein aktiver immuntherapeutischer Ansatz ist die Vakzinierung mit Peptiden, die Epitope von LAA repräsentieren. Vakzinierungsversuche wurden mit Peptiden unternommen, die z.B. von WT1 oder Proteinase 3 abgeleitet sind (87, 90).

Mäuse, die mit gereinigtem p53-Protein vakziniert wurden, waren in der Lage, die Tumorgenese von chemisch induzierten Hauttumoren zu unterdrücken (11).

Die oben genannten Peptide werden MHC-Klasse I-Molekül restringiert präsentiert und lösen eine CD8-positive T-Zell-Antwort aus. Zur Verstärkung der Immunantwort wurden unterschiedliche Adjuvantien, wie z.B. GM-CSF eingesetzt.

Der Vorteil einer Peptidimmunisierung liegt in der einfachen Herstellung der Vakzine sowie der klaren Vergleichbarkeit durch den Einsatz eines universellen Peptides. Nachteilig sind die Restriktion der Peptide auf bekannte LAA, die Restriktion auf einen bestimmten Haplotyp des Empfängers sowie die kurze Halbwertszeit eines HLA-Peptid-Komplexes. Die Forderung an ein aktives Tumorstoff, ist aber vor allem, lang anhaltende Immunität durch die Entwicklung von Gedächtniszellen zu erzeugen.

Autologe Tumorzellvakzine haben sich in einem Vakzinierungsregim nicht bewährt.

Die schlechte Vergleichbarkeit individuell behandelter Patienten, limitiertes Ausgangsmaterial mit reduzierter Avidität sowie die signifikanten Qualitätsunterschiede sind nur einige Gründe. Aufgrund dessen wurden unterschiedliche Modifikationsversuche an allogenen Tumorzelllinien unternommen mit dem Ziel, ubiquitäre Antigene über gemeinsame HLA-Restriktionselemente zu präsentieren und so eine Immunantwort gegen den autologen Tumor anzuregen.

Einer der ältesten Versuche zeigt, dass die einfache Vakzinierung von bestrahlten allogenen Blasten in Kombination mit BCG in verlängerten Remissionen resultierte. Ein verlängertes Überleben konnte jedoch nicht erreicht werden (37, 84, 85).

In einer kürzlich erschienen Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von allogenen AML-Zellen in Kombination mit unterschiedlichen Zytokinen (IL-2, IL-6, GM-CSF) in einigen Fällen eine komplette Remission erzielt werden konnte (138).

Genetische Veränderung von Tumorzellen ist eine weitere Strategie, eine Tumorzelle immunogener zu machen und Selbst-Toleranz zu durchbrechen. Die Einführung von MHC-Genen in einen Tumor zeigte in einigen Rattenmodellen eine erhöhte Antigenität des Tumors (131).

Die Transfizierung von Genen in Tumorzellen, die für unterschiedliche Zytokine kodieren, verfolgt mehrere Ziele gleichzeitig. Antigene werden verstärkt in Assoziation mit MHC-Molekülen präsentiert, antigenpräsentierende Zellen und sowohl CD4-positive als auch CD8-positive T-Zellen werden aktiviert. Unter den transfizierten Genen (IL-2, IL-4, INF- γ , TNF- α etc.) sind GM-CSF-Gen transfizierte Tumore diejenige, die am besten untersucht wurden. In vergleichenden Studien mit unterschiedlichen Zytokin-Gen-Transfizierungen scheint die Transfektion von GM-CSF am potentesten zu sein, solange GM-CSF auf einem hohen Level produziert wird (50). Soieffer et al modifizierten Tumorzellen von Melanom-Patienten durch Transfektion von Genen so, dass sie GM-CSF exprimierten. Die genetisch veränderten Tumorzellen

lösten im Gegensatz zu den nicht genetisch veränderten eine Immunantwort aus (108, 23, 112).

Der klare Nachteil dieser Methoden liegt in der viralen Transfektion. Das Risiko einer Mutagenese steigt und virale Vektoren sind per se immunogen. Schlussendlich könnte so ein potentestes leukämiespezifisches Antigen durch ein dominanteres virales Epitop maskiert werden (82).

Dendritische Zellen sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen des menschlichen Organismus. Aufgrund ihrer einzigartigen Struktur und ihrer für die Antigenpräsentation notwendigen Oberflächenantigene sind DZ fähig, eine Immunreaktion zu induzieren. Reife DZ sind in der Lage, in lymphatische Organe zu wandern, um dort mit T-Zellen zu interagieren.

Unterschiedliche Strategien, dendritische Zellen mit Leukämie assoziierten Antigenen zu beladen, wurden untersucht. Die Möglichkeit der Transfektion von Ribonukleinsäuren von Tumoren in DZ wurde von Ying et al beschrieben (137). Via retrovirale oder adenovirale Transfektion von Vektoren mit Tumorgensequenzen, die für Tumorantigene kodieren, gelang eine weitere Möglichkeit der Antigenpräsentation durch DZ (109, 110). Diese Methode scheint eine höhere Potenz zu haben als der Transfer von nackter DNS (34). Durch Transfektion von RNA in DZ, die für das HLA-A24-bindende Peptid Bax inhibitor-1 (BI-1) (einem Regulator der Zell-Apoptose) kodiert, können zytotoxische T-Lymphozyten generiert werden, die in der Lage sind, Leukämieblasten zu lysieren (101).

Durch den Einsatz von definierten Tumorantigenen in Form von gepulsten DZ kann eine vergleichbare, unter „Good medical practise“ (GMP)-Bedingungen erfolgte Vakzine verwendet werden. In den meisten Studien wurden HLA-restringierte Peptide benutzt, die sich von LAA ableiten und entweder Epitope für CD4-positive oder CD8-positive T-Zellen sein können.

Die Problematik dieser immuntherapeutischen Methoden liegt darin, dass nur eine bekannte und begrenzte Anzahl von LAA auf diesem Weg durch die dendritischen Zellen repräsentiert werden kann. Die dadurch begrenzte Aktivierung von einer sehr spezifischen Art von T-Zellen könnte zu einem Selektionsvorteil von Leukämiezellen führen, die das jeweilige LAA nur schwach exprimieren.

Zur Professionalisierung der Antigenpräsentation fusionierten wir dendritische Zellen und Leukämieblasten von AML-Patienten und generierten stabile Hybride.

Die Fusion hat gegenüber den oben genannten Strategien deutliche Vorteile. Durch Hybridzellen können alle potentiell möglichen Tumorantigene präsentiert werden, auch solche, die bis heute nicht als Tumorantigene identifiziert wurden. Sowohl MHC Klasse I- als auch MHC Klasse II-restringierte T-Zellen können durch die HZ aktiviert werden. Ebenfalls können durch HZ relativ stabil Antigene produziert und präsentiert werden (92).

6.4 Daten bestätigen eine erfolgreiche Fusion

Unsere Daten bestätigen, dass die hergestellten Hybride aus dendritischen Zellen und autologen sowie allogenen AML-Zellen die ganze funktionelle Potenz von dendritischen Zellen aufweisen. Die Bestimmung des Phänotyps der HZ zeigte eine Expression von MHC-Klasse-II Molekülen, den DZ-Markern CD209 und PKH-26 sowie den AML-Markern CD13 und PKH-67 (Abbildung 4).

Wir haben keine Hinweise darauf gefunden, dass die Fusion, entweder durch den Fusionsprozess bedingt oder durch die Integration der AML-Zellen, irgendeinen schädigenden oder toxischen Effekt auf die antigenpräsentierenden oder kostimulatorischen Eigenschaften des Fusions-Produktes hat. Der kontinuierliche Nachweis des CBF β /MYH11 Fusionsproduktes in den Hybriden mit inv(16)-positiven AML-Zellen mittels Western blots impliziert die kontinuierliche Expressierung von Leukämie-assoziierten Antigenen.

6.5 Bestätigung der TZ-Aktivierung durch Hybride

In der vorliegenden Arbeit etablierten und testeten wir die aktivierenden Eigenschaften eines Fusionproduktes aus dendritischen Zellen mit allogenen und autologen inv(16)-positiven und inv(16)-negativen AML-Zellen auf allogene und autologe T-Zellen.

Erstaunlicherweise zeigten nur die Versuchsansätze, bei denen inv(16)-positive AML-Zellen fusioniert wurden, eine signifikante Proliferation der T-Zellen.

Diese Beobachtung wird durch Vorversuche unserer Arbeitsgruppe bestärkt. Hierbei wurde gezeigt, dass T-Zellen, die zuvor mit AML-Blasten stimuliert wurden, eine zytolytische Potenz gegenüber AML-Zellen entwickelten. Es wurde jedoch nur bei vorheriger Stimulation mit inv(16)-positiven AML-Zellen eine signifikante zytolytische Reaktion der CD8-positiven T-Zellen beobachtet. Sowohl durch die Blockierung des MHC-Klasse-I Rezeptors als auch durch Blockade des CD8-Rezeptors konnte die

zytolytische Aktivität der Effektorzelle gehemmt werden (7). Unsere Beobachtung stärkt die Hypothese, dass das Fusionsprotein der inv(16)-positiven AML im Kontext mit MHC-Klasse-I Molekülen präsentiert, als Tumorantigen wirksam sein könnte und für die bessere Prognose dieser chromosomalen Anomalität gegenüber anderen AML-Formen verantwortlich ist.

6.6 Heilungsversuch

Der klinische Heilungsverlauf wurde im Stadium einer zytogenetisch nachgewiesenen minimalen Resterkrankung durchgeführt. Die Blastenproliferation wurde jeweils über einen längeren Zeitraum verhindert. In unseren Untersuchungen haben wir die Anti-Tumor-Wirkung, die durch die Hybridvakzine induziert wurde, im Rahmen von Proliferationstests überprüft.

Niedrig dosierte und niedrigfrequente Vakzinierung führte zu einer Immunstimulation besonders der CD4-positiven T-Zellen. Die T-Zellen der Patientin zeigten nach der Vakzinierung eine verstärkte, CD4-positive Reaktion auf die Stimulierung durch autologe AML-Zellen, doch scheint diese wenig spezifisch zu sein, da auch eine ähnliche Reaktion durch die Stimulierung mit den Kontrolltargets ausgelöst werden konnte.

Als Konsequenz der Ergebnisse des ersten Heilungsversuches wurde der zweite Heilungsversuch mit einer erhöhten Dosis der Vakzine in erhöhter Vakzinierungsfrequenz durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine Hybridvakzinierung in hoher Frequenz und hoher Dosierung neben einer unspezifischen Immunstimulation eine hoch spezifische Immunantwort gegenüber den inv(16)-positiven AML-Zellen der Patientin auslöst. Die Immunantwort lag auf der Seite der CD8-positiven T-Zellen.

In dem Proliferationstest 40 Tage nach der letzten Vakzinierung hat die proliferative Aktivität gegenüber den Kontrolltargets im Verhältnis zu der proliferativen Aktivität vor Vakzinierung abgenommen, insbesondere die proliferative Aktivität der CD8-positiven T-Zellen. In der Reaktion auf die autologen AML-Zellen zeigte sich eine anhaltende proliferative Aktivität vergleichbar mit derjenigen 10 Tage nach Vakzinierung. Es ist also davon auszugehen, dass die initial aktivierten CD8-positiven T-Zellen in Effektorgedächtniszellen überführt wurden, die nach erneutem Antigenkontakt für eine schnelle und effektive Immunantwort zur Verfügung standen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigen, dass Fusionshybride generiert aus inv(16) Abnormalität tragenden AML-Blasten und autologen dendritischen Zellen einen Proliferationsreiz für autologe T-Lymphozyten bieten. Fusionshybride mit inv(16)-negativen AML-Blasten bieten keinen signifikanten proliferativen Anreiz für autologe T-Lymphozyten.

Durch eine repetitive Vakzinierung mit autologen Fusionsprodukten einer inv(16)-positiven AML-Patientin konnte eine lang anhaltende CD8-positive Immunantwort gegen autologe AML-Zellen in vitro ausgelöst werden. Unsere Arbeiten lassen den Schluss zu, dass das Fusionsprodukt CBF β /MYH11 ein neoantigenes Merkmal bereitstellt, das MHC-Molekül Klasse-I restringiert eine Aktivierung von CD8-positiven T-Lymphozyten nach sich zieht (Abbildung 32).

Abb.: 32)

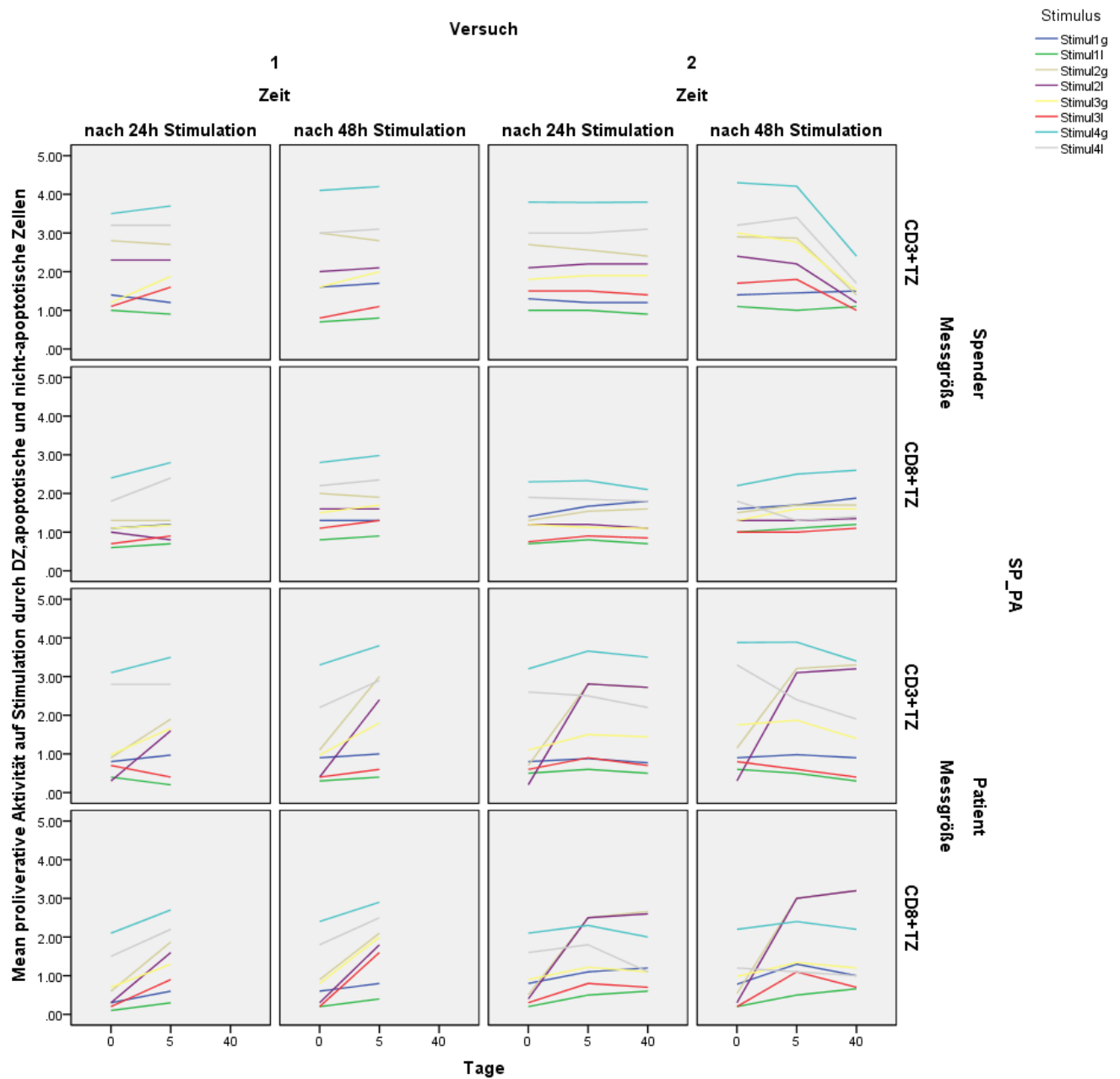


Abbildung 32 Die Ergebnisse der beiden Heilungsversuche sind als proliferative Aktivität der TZ der Patientin sowie des Spenders als Reaktion auf die unterschiedlichen Stimuli im zeitlichen Verlauf dargestellt. Unterschieden werden Gesamtzellzahl (g) von rein nicht-apoptotischen Zellen (l). Stimul1=DZ; Stimul2= AML inv(16) Zellen; Stimul3= AML inv(16)-negative Zellen; Stimul4= allogene PBMCs.

6.7 Fehlerquellen

Zur Reduktion der auftretenden Fehler haben wir alle beeinflussbaren Faktoren durch sorgfältiges Arbeiten, Standardisierung und objektive Messverfahren, soweit möglich, eliminiert.

Nicht von uns beeinflussbar war das Auftreten von zufälligen Effekten im Heilungsversuch, da wir diesen nur bei einer Patientin durchführten. Deshalb können wir in diesem Experiment zwar Aussagen darüber treffen, dass eine Hybridvakzinierung bei dieser Patientin zu einer lang anhaltenden T-Zell Aktivierung führte, nicht jedoch, ob dieser Effekt auch bei anderen Patienten mit einer inv(16)-positiven AML auslösbar wäre.

6.8 Ausblick

In zukünftigen Untersuchungen sollte die Hybridvakzinierung an einem größeren Kollektiv von Patienten durchgeführt werden. Als Quelle für eine nicht-limitierte Menge an DZ könnten pluripotente Stammzellen dienen (135). Nur so können statistisch signifikante Ergebnisse erhalten und eine anwendbare immunologische Therapie etabliert werden. Gleichzeitig ist anzustreben, das Genom einer AML Zelle in eine DZ zu schleusen. An den so entstandenen Hybridzellen könnte untersucht werden, ob es sich bei dem Tumorantigen um das expriemierte Fusionsprotein CBFbeta/MHY11 handelt oder um ein anderes Protein.

Um die immunologischen Therapiemöglichkeiten zu verbessern, ist es sinnvoll, eine durch HZ aktivierte T-Zelle zu klonen. Der Transfer dieser aktivierten T-Zellen zusammen mit einer Hybridvakzinierung könnte den von uns gezeigten Therapieeffekt verstärken.

Es ist davon auszugehen, dass der therapeutische Effekt durch die Transfektion von zusätzlichen, für Zytokine und aktivierende Faktoren kodierende Gene, in die DZ verstärkt wird. So konnte gezeigt werden, dass DZ, die zusätzlich zu AML-Antigenen mit einer bifunktionalen, für IL-10 und Aktivierung des TLRs kodierenden RNA beladen wurden, in einem Leukämie-Rattenmodell zu einem verlängerten Überleben und einer verringerten Knochenmarksinfiltration im Rahmen einer Vakzinierung führten (49). Ebenfalls wäre es möglich, durch die Kombination mit niedrig dosiertem IL-2 sowie IL-15 die zytotoxische Aktivität der zytotoxischen TZ gegen die AML-Blasten noch zu verstärken (92). Auch ist bekannt, dass durch die Kombination mit GM-CSF

eine Antigenpräsentation von AML-Zellen verstärkt werden kann. Interferon führt zu einer verstärkten MHC Expression der Blasten und somit zu einer Verstärkung der zytotoxischen Aktivität der Lymphozyten (15). Der Erfolg dieser Immuntherapie scheint von einem gewissen Grad einer Immunablation abzuhängen.

Verschiedene Mechanismen scheinen für diesen Effekt verantwortlich zu sein.

CD8-positive T-Zellen wurden als potenteste Effektorzellen für eine Antitumorantwort beschrieben (96). Das Entfernen der regulatorischen CD4+CD25+ T-Zellen aus dem peripheren Blut scheint zu einer Anreicherung von T-Helferzellen zu führen, die die tumorspezifischen, CD8-positiven T-Zellen in ihrer Immunantwort stärken (3).

Suppressorzellen unterdrücken autoreaktive T-Zellen und somit die Immunantwort gegen Autoantigene und eine Vielzahl von Tumorantigenen. Diese suppressive Funktion liegt auf der Seite der CD4-positiven TZ, die auf einem hohen Level CD25 exprimieren (24, 77). Diese suppressiven Zellen unterdrücken ZTL, NK-Zellen und BZ und werden in hohen Zahlen in kutanen TZ-Lymphomen gefunden. Die Elimination der CD4(+)/CD25 Zellen könnte den oben beschriebenen therapeutischen Effekt verstärken.

7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Evaluation von Immunantworten als Reaktion auf eine Stimulation durch Hybride aus dendritischen Zellen und AML-Zellen.

Zur Fusion wurde eine Kombination aus Polyethylenglycol- und Elektroporationsfusion verwendet. Die Bestimmung des Phänotyps der stabilen Hybridzellen zeigte eine Expression von MHC-Klasse II-Molekülen, den DZ-Markern CD209 und PKH-26, den AML-Markern CD13 und PKH-67 und den kostimulatorischen Molekülen CD40, CD58, CD80 und CD83. Kontinuierlich konnten wir das CBF β /MYH11-Fusionsprodukt in den Hybriden mit inv(16)-positiven AML-Zellen mittels Western blots nachweisen. Die Aktivierungsfähigkeit der Hybridzellen auf T-Lymphozyten wurde in Proliferationstests untersucht und durchflusszytometrisch ausgewertet. Die Analysen zeigten, dass Fusionshybride generiert aus inv(16)-Abnormalität tragenden AML-Blasten und autologen dendritischen Zellen einen Proliferationsreiz für autologe T-Lymphozyten bieten. Fusionshybride mit inv(16)-negativen AML-Blasten bieten keinen signifikanten proliferativen Anreiz für autologe T-Lymphozyten. Die in vitro erarbeiteten Ergebnisse führten zu einem Heilungsversuch. Die 59 jährige-Patientin mit nachgewiesener inv(16)-positiver AML-Erkrankung erlitt trotz wiederholter verschiedener Chemotherapiezyklen und Rezidivchemotherapie immer wieder einen Rückfall der Erkrankung. Bei fehlendem KM-Spender, intensiver Aufklärung sowie Einverständnis durch die Patientin wurden s.c. Vakzinierungen, mit bestrahlten Fusionszellen bestehend aus autologen dendritischen Zellen und AML-Blasten ohne Adjuvans konsolidierend durchgeführt. Um nachzuweisen, dass die Vakzinierung mit HZ zu einer AML-Zellen-spezifischen Immunantwort führt, wurden in vitro Analysen mit aus Knochenmark gewonnenen T-Zellen sowohl vor als auch nach Vakzinierung durchgeführt. Wir konnten zeigen, dass der durch eine Vakzinierung ausgelöste Effekt eng mit der Dosierung und der Frequenz der Vakzinierung assoziiert ist. Durch niederfrequente, niedrig dosierte Vakzinierung wurde eine unspezifische Immunstimulation erreicht. Durch hochfrequente, hochdosierte Vakzinierungen konnte eine spezifische, lang anhaltende CD8-positive Immunantwort gegen autologe AML-Zellen in vitro ausgelöst werden. Unsere Auffindungen suggerieren, dass das Fusionsprodukt CBF β /MYH11 ein neoantigenes Merkmal bereitstellt, das MHC-Molekül Klasse-I restringiert eine Aktivierung von CD8-positiven T-Lymphozyten nach sich zieht.

7.1 Summary

Aim of this work has been to evaluate the answer induced by elicitation of the immune system with hybrid cells derived from dendritic and AML cells.

Cell fusion has been conducted using a combination of polyethylene glycole and electroporation methods. Phenotype determination of stable hybrid cells showed expression of MHC classe II molecules, DZ-markers CD209 and PKH-26, AML-markers CD13 and PKH-67 as well as the co-stimulating molecules CD40, CD58, CD80 and CD83. We were able to trace the CBF β /MYH11 fusion product within the hybrids with inv(16)-positive AML cells by western blots continuously. The hybrid cell's ability to activate T lymphocytes was examined by proliferation tests and plotted by flow cytometry. Analyses revealed a proliferation stimulus for autologic T lymphocytes by fusion hybrids generated from inv(16)anomalousness carrying AML blasts and autologic dendritic cells. Fusion hybrids with inv(16)-negative AML blasts showed no significant proliferation stimulus for autologic T lymphocytes. Assessment of results from the in vitro experiments indicated a cure treatment. A patient of 59 years with confirmed inv(16)-positive AML disease suffered from ever repeating relapse of the disease despite repeated, different chemotherapy cycles and relapse chemotherapy. Without a matching bm donor, after comprehensive information and consent given by the patient, consolidating s.c. vaccinations with irradiated fusion cells from autologic dendritic cells and AML blasts without adjuvans were applied. To account for specific AML cell immune reaction to the vaccination with hybrid cells, in vitro analyses were conducted with T cells of bone marrow before and after vaccination. We showed an association of the elicited effect closely related with dosage and frequency of the vaccination. A low frequent, low dosage vaccination yielded an unspecific effect, while a high frequency, high dosage vaccination led to a specific and longly lasting CD8-positive immune reaction against autologic AML cells in vitro. Our findings suggest that the fusion product CBF β /MYH11 provides a neo-antigenic feature, which restrings the MHC molecule class I and initiates activation of CD8-positive T lymphocytes.

8 Statistik

8.1 Univariate Varianzanalyse

Between-Subjects Factors

		Value Label	N
Tage	0		64
	5		64
	40		64
SP_PA	1	Spender	96
	2	Patient	96
Messgröße	1	CD3+TZ	96
	2	CD8+TZ	96
Zeit	1	nach 24h Stimulation	96
	2	nach 48h Stimulation	96
Stimulus	1	Stimul1g = DZ Patientin (apoptotische und nicht apoptotische Zellen)	24
	2	Stimul1l = DZ Patientin (nicht apoptotische Zellen)	24
	3	Stimul2g = AML inv(16)-positive Zellen (apoptotische und nicht apoptotische Zellen)	24
	4	Stimul2l = AML inv(16)-positive Zellen (nicht apoptotische Zellen)	24
	5	Stimul3g = AML inv(16)-negative Zellen (apoptotische und nicht apoptotische Zellen)	24
	6	Stimul3l = AML inv(16)-negative Zellen (nicht apoptotische Zellen)	24
	7	Stimul4g = allogene PBMCs (apoptotische und nicht apoptotische Zellen)	24
	8	Stimul4l = allogene PBMCs (nicht apoptotische Zellen)	24

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: proliferative Aktivität auf Stimulation durch DZ, apoptotische und nicht-apoptotische Zellen

Corrected Model	167,970 ^a	90	1,866	40,542	,000
Intercept	538,077	1	538,077	11688,527	,000
Tage	4,463	2	2,231	48,471	,000
SP_PA	2,995	1	2,995	65,060	,000
Messgröße	14,073	1	14,073	305,694	,000
Zeit	,492	1	,492	10,689	,001
Stimulus	89,398	7	12,771	277,424	,000
SP_PA * Messgröße	,972	1	,972	21,111	,000
Messgröße * Stimulus	12,375	7	1,768	38,404	,000
Tage * Messgröße	1,792	2	,896	19,467	,000
SP_PA * Stimulus	5,360	7	,766	16,634	,000
Tage * SP_PA	6,163	2	3,081	66,937	,000
Tage * Stimulus	11,902	14	,850	18,467	,000
Zeit * Stimulus	1,083	7	,155	3,361	,003
Tage * Zeit	,619	2	,309	6,720	,002
SP_PA * Messgröße * Stimulus	1,288	7	,184	3,998	,001
Tage * SP_PA * Messgröße	,395	2	,198	4,291	,016
Tage * Messgröße * Zeit	1,424	3	,475	10,314	,000
Tage * SP_PA * Stimulus	12,005	14	,858	18,628	,000
SP_PA * Zeit *	,763	7	,109	2,368	,028

Stimulus					
Tage * SP_PA * Zeit	,383	2	,192	4,161	,018
Error	4,649	101	,046		
Total	710,696	192			
Corrected Total	172,619	191			

Depended Variable: proliferative Aktivität auf Stimulation durch DZ, apoptotische und nicht-apoptotische Zellen

Zeit			Tag		Mean	Std. Error	95% Confidence Interval	
							Lower Bound	Upper Bound
nach 24h Stimulation	Spender	CD3+TZ	0	Stimul1g	1,138	,148	,845	1,431
				Stimul1l	,843	,148	,550	1,136
				Stimul2g	2,520	,148	2,227	2,813
				Stimul2l	2,135	,148	1,842	2,428
				Stimul3g	1,968	,148	1,675	2,261
				Stimul3l	1,414	,148	1,121	1,707
				Stimul4g	3,791	,148	3,498	4,084
				Stimul4l	3,201	,148	2,908	3,494
			5	Stimul1g	1,240	,148	,947	1,533
				Stimul1l	,890	,148	,597	1,183
				Stimul2g	2,609	,148	2,316	2,902
				Stimul2l	2,131	,148	1,838	2,424
				Stimul3g	2,012	,148	1,719	2,305
				Stimul3l	1,498	,148	1,205	1,791
				Stimul4g	3,871	,148	3,578	4,164
				Stimul4l	3,136	,148	2,843	3,429
			40	Stimul1g	1,422	,148	1,129	1,715
				Stimul1l	,982	,148	,689	1,275
				Stimul2g	2,309	,148	2,016	2,602
				Stimul2l	1,962	,148	1,669	2,255
				Stimul3g	1,785	,148	1,492	2,078
				Stimul3l	1,378	,148	1,085	1,671
				Stimul4g	3,481	,148	3,188	3,774
				Stimul4l	2,841	,148	2,548	3,134
		CD8+TZ	0	Stimul1g	1,397	,148	1,103	1,690

				Stimul1l	,668	,148	,375	,961
				Stimul2g	1,530	,148	1,237	1,823
				Stimul2l	1,252	,148	,958	1,545
				Stimul3g	1,067	,148	,773	1,360
				Stimul3l	,789	,148	,496	1,082
				Stimul4g	2,338	,148	2,045	2,631
				Stimul4l	1,902	,148	1,608	2,195
			5	Stimul1g	1,480	,148	1,187	1,773
				Stimul1l	,697	,148	,404	,990
				Stimul2g	1,601	,148	1,308	1,894
				Stimul2l	1,230	,148	,937	1,523
				Stimul3g	1,093	,148	,800	1,386
				Stimul3l	,855	,148	,562	1,148
				Stimul4g	2,399	,148	2,106	2,692
				Stimul4l	1,818	,148	1,525	2,111
			40	Stimul1g	1,893	,148	1,600	2,186
				Stimul1l	1,020	,148	,727	1,313
				Stimul2g	1,532	,148	1,239	1,825
				Stimul2l	1,291	,148	,998	1,584
				Stimul3g	1,096	,148	,803	1,389
				Stimul3l	,966	,148	,673	1,259
				Stimul4g	2,240	,148	1,947	2,533
				Stimul4l	1,753	,148	1,460	2,046
	Patient	CD3+TZ	0	Stimul1g	,702	,148	,409	,995
				Stimul1l	,402	,148	,109	,695
				Stimul2g	,624	,148	,331	,917
				Stimul2l	,158	,148	-,135	,452
				Stimul3g	1,256	,148	,963	1,549
				Stimul3l	,495	,148	,202	,788
				Stimul4g	3,425	,148	3,132	3,718
				Stimul4l	2,828	,148	2,535	3,122
			5	Stimul1g	,917	,148	,624	1,210

				Stimul1l	,522	,148	,229	,815
				Stimul2g	2,752	,148	2,459	3,045
				Stimul2l	2,681	,148	2,388	2,974
				Stimul3g	1,526	,148	1,233	1,819
				Stimul3l	,840	,148	,547	1,133
				Stimul4g	3,613	,148	3,320	3,906
				Stimul4l	2,573	,148	2,280	2,867
			40	Stimul1g	,934	,148	,641	1,227
				Stimul1l	,626	,148	,333	,919
				Stimul2g	2,956	,148	2,663	3,249
				Stimul2l	2,873	,148	2,580	3,166
				Stimul3g	1,443	,148	1,150	1,736
				Stimul3l	,730	,148	,437	1,023
				Stimul4g	3,440	,148	3,147	3,733
				Stimul4l	2,288	,148	1,995	2,581
		CD8+TZ	0	Stimul1g	,849	,148	,556	1,142
				Stimul1l	,334	,148	,041	,627
				Stimul2g	,365	,148	,072	,658
				Stimul2l	,092	,148	-,201	,385
				Stimul3g	,858	,148	,565	1,151
				Stimul3l	,451	,148	,158	,744
				Stimul4g	2,026	,148	1,733	2,319
				Stimul4l	1,634	,148	1,341	1,927
			5	Stimul1g	1,166	,148	,873	1,459
				Stimul1l	,556	,148	,263	,849
				Stimul2g	2,594	,148	2,301	2,887
				Stimul2l	2,717	,148	2,424	3,010
				Stimul3g	1,230	,148	,937	1,523
				Stimul3l	,898	,148	,605	1,191
				Stimul4g	2,315	,148	2,022	2,608
				Stimul4l	1,481	,148	1,188	1,774
			40	Stimul1g	,983	,148	,690	1,276

				Stimul1l	,460	,148	,167	,753
				Stimul2g	2,598	,148	2,305	2,891
				Stimul2l	2,708	,148	2,415	3,001
				Stimul3g	,947	,148	,654	1,240
				Stimul3l	,587	,148	,294	,880
				Stimul4g	1,942	,148	1,649	2,235
				Stimul4l	,995	,148	,702	1,288
nach 48h Stimulation	Spender	CD3+TZ	0	Stimul1g	1,617	,148	1,324	1,910
				Stimul1l	1,395	,148	1,102	1,688
				Stimul2g	2,834	,148	2,541	3,127
				Stimul2l	2,412	,148	2,119	2,705
				Stimul3g	2,747	,148	2,454	3,040
				Stimul3l	1,849	,148	1,556	2,142
				Stimul4g	4,125	,148	3,832	4,418
				Stimul4l	3,212	,148	2,919	3,505
			5	Stimul1g	1,581	,148	1,288	1,874
				Stimul1l	1,304	,148	1,011	1,597
				Stimul2g	2,785	,148	2,492	3,078
				Stimul2l	2,271	,148	1,978	2,564
				Stimul3g	2,653	,148	2,360	2,946
				Stimul3l	1,796	,148	1,503	2,089
				Stimul4g	4,067	,148	3,773	4,360
				Stimul4l	3,008	,148	2,715	3,301
			40	Stimul1g	1,052	,148	,759	1,345
				Stimul1l	,686	,148	,393	,979
				Stimul2g	1,774	,148	1,481	2,067
				Stimul2l	1,390	,148	1,097	1,683
				Stimul3g	1,715	,148	1,422	2,008
				Stimul3l	,965	,148	,672	1,258
				Stimul4g	2,966	,148	2,673	3,259
				Stimul4l	2,002	,148	1,709	2,295

		CD8+TZ	0	Stimul1g	1,549	,148	1,256	1,842
				Stimul1l	,894	,148	,601	1,187
				Stimul2g	1,517	,148	1,224	1,810
				Stimul2l	1,202	,148	,909	1,495
				Stimul3g	1,519	,148	1,226	1,812
				Stimul3l	,898	,148	,605	1,191
				Stimul4g	2,345	,148	2,052	2,638
				Stimul4l	1,585	,148	1,292	1,878
			5	Stimul1g	1,719	,148	1,426	2,012
				Stimul1l	1,009	,148	,716	1,302
				Stimul2g	1,675	,148	1,382	1,968
				Stimul2l	1,268	,148	,975	1,561
				Stimul3g	1,632	,148	1,339	1,925
				Stimul3l	1,051	,148	,758	1,344
				Stimul4g	2,493	,148	2,200	2,787
				Stimul4l	1,588	,148	1,295	1,882
			40	Stimul1g	2,012	,148	1,719	2,305
				Stimul1l	1,212	,148	,919	1,505
				Stimul2g	1,485	,148	1,192	1,778
				Stimul2l	1,208	,148	,915	1,501
				Stimul3g	1,514	,148	1,221	1,807
				Stimul3l	1,041	,148	,748	1,334
				Stimul4g	2,214	,148	1,921	2,507
				Stimul4l	1,404	,148	1,111	1,697
	Patient	CD3+TZ	0	Stimul1g	,954	,148	,661	1,247
				Stimul1l	,579	,148	,286	,872
				Stimul2g	1,244	,148	,951	1,537
				Stimul2l	,671	,148	,378	,964
				Stimul3g	1,670	,148	1,377	1,963
				Stimul3l	,663	,148	,370	,956
				Stimul4g	3,828	,148	3,535	4,121
				Stimul4l	2,879	,148	2,586	3,172

			5	Stimul1g	1,015	,148	,722	1,308
				Stimul1l	,545	,148	,252	,838
				Stimul2g	3,217	,148	2,924	3,510
				Stimul2l	3,039	,148	2,746	3,332
				Stimul3g	1,786	,148	1,493	2,079
				Stimul3l	,853	,148	,560	1,146
				Stimul4g	3,861	,148	3,568	4,154
				Stimul4l	2,470	,148	2,177	2,763
			40	Stimul1g	,708	,148	,415	1,001
				Stimul1l	,326	,148	,033	,619
				Stimul2g	3,097	,148	2,804	3,390
				Stimul2l	2,907	,148	2,614	3,200
				Stimul3g	1,379	,148	1,086	1,672
				Stimul3l	,419	,148	,126	,712
				Stimul4g	3,364	,148	3,071	3,657
				Stimul4l	1,861	,148	1,568	2,154
		CD8+TZ	0	Stimul1g	,775	,148	,482	1,068
				Stimul1l	,185	,148	-,108	,478
				Stimul2g	,657	,148	,364	,950
				Stimul2l	,278	,148	-,015	,571
				Stimul3g	,946	,148	,653	1,239
				Stimul3l	,291	,148	-,002	,584
				Stimul4g	2,101	,148	1,808	2,394
				Stimul4l	1,358	,148	1,065	1,651
			5	Stimul1g	1,162	,148	,869	1,455
				Stimul1l	,477	,148	,184	,770
				Stimul2g	2,957	,148	2,664	3,250
				Stimul2l	2,973	,148	2,680	3,266
				Stimul3g	1,388	,148	1,095	1,681
				Stimul3l	,809	,148	,516	1,102
				Stimul4g	2,461	,148	2,168	2,754
				Stimul4l	1,276	,148	,983	1,569

			40	Stimul1g	1,246	,148	,953	1,539
				Stimul1l	,648	,148	,355	,941
				Stimul2g	3,228	,148	2,935	3,521
				Stimul2l	3,231	,148	2,938	3,524
				Stimul3g	1,371	,148	1,078	1,664
				Stimul3l	,765	,148	,472	1,058
				Stimul4g	2,355	,148	2,062	2,648
				Stimul4l	1,056	,148	,763	1,349

8.2 Paarweise Vergleiche

Dependent Variable: proliferative Aktivität auf Stimulation durch DZ, apoptotische und nicht-apoptotische Zellen

Zeit						Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b	
									Lower Bound	Upper Bound
nach 24h Stimulation	Spender	CD3+TZ	0	Stimul1g	Stimul1l	,295	,196	1,000	-,334	,924
					Stimul2g	-1.382 [*]	,196	,000	-2,010	-,753
					Stimul2l	-,997 [*]	,196	,000	-1,625	-,368
					Stimul3g	-,830 [*]	,196	,001	-1,459	-,201
					Stimul3l	-,276	,196	1,000	-,904	,353
					Stimul4g	-2.653 [*]	,196	,000	-3,282	-2,025
					Stimul4l	-2.063	,196	,000	-2,692	-1,435
				Stimul1l	Stimul1g	-,295	,196	1,000	-,924	,334
					Stimul2g	-1.677 [*]	,196	,000	-2,305	-1,048
					Stimul2l	-1.292 [*]	,196	,000	-1,920	-,663
					Stimul3g	-1.125 [*]	,196	,000	-1,754	-,496
					Stimul3l	-,571	,196	,123	-1,199	,058
					Stimul4g	-2.948 [*]	,196	,000	-3,577	-2,320
					Stimul4l	-2.358 [*]	,196	,000	-2,987	-1,730
				Stimul2g	Stimul1g	1.382 [*]	,196	,000	,753	2,010
					Stimul1l	1.677 [*]	,196	,000	1,048	2,305
					Stimul2l	,385	,196	1,000	-,244	1,014
					Stimul3g	,552	,196	,163	-,077	1,180
					Stimul3l	1.106 [*]	,196	,000	,477	1,734
					Stimul4g	-1.272 [*]	,196	,000	-1,900	-,643
					Stimul4l	-,682	,196	,021	-1,310	-,053
				Stimul2l	Stimul1g	,997 [*]	,196	,000	,368	1,625
					Stimul1l	1.292 [*]	,196	,000	,663	1,920
					Stimul2g	-,385	,196	1,000	-1,014	,244
					Stimul3g	,167	,196	1,000	-,462	,795
					Stimul3l	,721 [*]	,196	,011	,092	1,349
					Stimul4g	-1.657 [*]	,196	,000	-2,285	-1,028
					Stimul4l	-1.067 [*]	,196	,000	-1,695	-,438
				Stimul3g	Stimul1g	,830 [*]	,196	,001	,201	1,459
					Stimul1l	1.125 [*]	,196	,000	,496	1,754
					Stimul2g	-,552	,196	,163	-1,180	,077
					Stimul2l	-,167	,196	1,000	-,795	,462
					Stimul3l	,554	,196	,158	-,074	1,183
					Stimul4g	-1.823 [*]	,196	,000	-2,452	-1,195
					Stimul4l	-1.233 [*]	,196	,000	-1,862	-,605
				Stimul3l	Stimul1g	,276	,196	1,000	-,353	,904
					Stimul1l	,571	,196	,123	-,058	1,199

					Stimul2g	-1.106	,196	,000	-1,734	-,477
					Stimul2l	-.721	,196	,011	-1,349	-,092
					Stimul3g	-,554	,196	,158	-1,183	,074
					Stimul4g	-2.378	,196	,000	-3,006	-1,749
					Stimul4l	-1.788	,196	,000	-2,416	-1,159
				Stimul4g	Stimul1g	2.653	,196	,000	2,025	3,282
					Stimul1l	2.948	,196	,000	2,320	3,577
					Stimul2g	1.272	,196	,000	,643	1,900
					Stimul2l	1.657	,196	,000	1,028	2,285
					Stimul3g	1.823	,196	,000	1,195	2,452
					Stimul3l	2.378	,196	,000	1,749	3,006
					Stimul4l	,590	,196	,092	-,039	1,219
				Stimul4l	Stimul1g	2.063	,196	,000	1,435	2,692
					Stimul1l	2.358	,196	,000	1,730	2,987
					Stimul2g	,682	,196	,021	,053	1,310
					Stimul2l	1.067	,196	,000	,438	1,695
					Stimul3g	1.233	,196	,000	,605	1,862
					Stimul3l	1.788	,196	,000	1,159	2,416
					Stimul4g	-,590	,196	,092	-1,219	,039
			5	Stimul1g	Stimul1l	,350	,196	1,000	-,279	,979
					Stimul2g	-1.369	,196	,000	-1,998	-,741
					Stimul2l	-,892	,196	,000	-1,520	-,263
					Stimul3g	-,773	,196	,004	-1,401	-,144
					Stimul3l	-,258	,196	1,000	-,887	,370
					Stimul4g	-2.631	,196	,000	-3,259	-2,002
					Stimul4l	-1.896	,196	,000	-2,524	-1,267
				Stimul1l	Stimul1g	-,350	,196	1,000	-,979	,279
					Stimul2g	-1.719	,196	,000	-2,348	-1,091
					Stimul2l	-1.242	,196	,000	-1,870	-,613
					Stimul3g	-1.123	,196	,000	-1,751	-,494
					Stimul3l	-,608	,196	,069	-1,237	,020
					Stimul4g	-2.981	,196	,000	-3,609	-2,352
					Stimul4l	-2.246	,196	,000	-2,874	-1,617
				Stimul2g	Stimul1g	1.369	,196	,000	,741	1,998
					Stimul1l	1.719	,196	,000	1,091	2,348
					Stimul2l	,478	,196	,463	-,151	1,106
					Stimul3g	,597	,196	,083	-,032	1,225
					Stimul3l	1.111	,196	,000	,482	1,739
					Stimul4g	-1.262	,196	,000	-1,890	-,633
					Stimul4l	-,527	,196	,235	-1,155	,102
				Stimul2l	Stimul1g	,892	,196	,000	,263	1,520
					Stimul1l	1.242	,196	,000	,613	1,870
					Stimul2g	-,478	,196	,463	-1,106	,151
					Stimul3g	,119	,196	1,000	-,509	,748
					Stimul3l	,633	,196	,046	,005	1,262
					Stimul4g	-1.739	,196	,000	-2,368	-1,111
					Stimul4l	-1.004	,196	,000	-1,633	-,376
				Stimul3g	Stimul1g	,773	,196	,004	,144	1,401

					Stimul1l	1.123	,196	,000	,494	1,751
					Stimul2g	-,597	,196	,083	-1,225	,032
					Stimul2l	-,119	,196	1,000	-,748	,509
					Stimul3l	,514	,196	,280	-,114	1,143
					Stimul4g	-1.858	,196	,000	-2,487	-1,230
					Stimul4l	-1.123	,196	,000	-1,752	-,495
				Stimul3l	Stimul1g	,258	,196	1,000	-,370	,887
					Stimul1l	,608	,196	,069	-,020	1,237
					Stimul2g	-1.111	,196	,000	-1,739	-,482
					Stimul2l	-,633	,196	,046	-1,262	-,005
					Stimul3g	-,514	,196	,280	-1,143	,114
					Stimul4g	-2.373	,196	,000	-3,001	-1,744
					Stimul4l	-1.638	,196	,000	-2,266	-1,009
				Stimul4g	Stimul1g	2.631	,196	,000	2,002	3,259
					Stimul1l	2.981	,196	,000	2,352	3,609
					Stimul2g	1.262	,196	,000	,633	1,890
					Stimul2l	1.739	,196	,000	1,111	2,368
					Stimul3g	1.858	,196	,000	1,230	2,487
					Stimul3l	2.373	,196	,000	1,744	3,001
					Stimul4l	,735	,196	,008	,106	1,364
				Stimul4l	Stimul1g	1.896	,196	,000	1,267	2,524
					Stimul1l	2.246	,196	,000	1,617	2,874
					Stimul2g	,527	,196	,235	-,102	1,155
					Stimul2l	1.004	,196	,000	,376	1,633
					Stimul3g	1.123	,196	,000	,495	1,752
					Stimul3l	1.638	,196	,000	1,009	2,266
					Stimul4g	-,735	,196	,008	-1,364	-,106
			40	Stimul1g	Stimul1l	,440	,196	,752	-,189	1,069
					Stimul2g	-,887	,196	,000	-1,515	-,258
					Stimul2l	-,539	,196	,196	-1,168	,089
					Stimul3g	-,362	,196	1,000	-,991	,266
					Stimul3l	,044	,196	1,000	-,584	,673
					Stimul4g	-2.058	,196	,000	-2,687	-1,430
					Stimul4l	-1.418	,196	,000	-2,047	-,790
				Stimul1l	Stimul1g	-,440	,196	,752	-1,069	,189
					Stimul2g	-1.327	,196	,000	-1,955	-,698
					Stimul2l	-,979	,196	,000	-1,608	-,351
					Stimul3g	-,803	,196	,002	-1,431	-,174
					Stimul3l	-,396	,196	1,000	-1,024	,233
					Stimul4g	-2.498	,196	,000	-3,127	-1,870
					Stimul4l	-1.858	,196	,000	-2,487	-1,230
				Stimul2g	Stimul1g	,887	,196	,000	,258	1,515
					Stimul1l	1.327	,196	,000	,698	1,955
					Stimul2l	,347	,196	1,000	-,281	,976
					Stimul3g	,524	,196	,243	-,104	1,153
					Stimul3l	,931	,196	,000	,302	1,559
					Stimul4g	-1.172	,196	,000	-1,800	-,543
					Stimul4l	-,532	,196	,219	-1,160	,097

				Stimul2l	Stimul1g	,539	,196	,196	-,089	1,168
					Stimul1l	,979	,196	,000	,351	1,608
					Stimul2g	-,347	,196	1,000	-,976	,281
					Stimul3g	,177	,196	1,000	-,452	,805
					Stimul3l	,583	,196	,102	-,045	1,212
					Stimul4g	-1.519	,196	,000	-2,148	-,891
					Stimul4l	-,879	,196	,001	-1,508	-,251
				Stimul3g	Stimul1g	,362	,196	1,000	-,266	,991
					Stimul1l	,803	,196	,002	,174	1,431
					Stimul2g	-,524	,196	,243	-1,153	,104
					Stimul2l	-,177	,196	1,000	-,805	,452
					Stimul3l	,407	,196	1,000	-,222	1,035
					Stimul4g	-1.696	,196	,000	-2,324	-1,067
					Stimul4l	-1.056	,196	,000	-1,684	-,427
				Stimul3l	Stimul1g	-,044	,196	1,000	-,673	,584
					Stimul1l	,396	,196	1,000	-,233	1,024
					Stimul2g	-,931	,196	,000	-1,559	-,302
					Stimul2l	-,583	,196	,102	-1,212	,045
					Stimul3g	-,407	,196	1,000	-1,035	,222
					Stimul4g	-2.103	,196	,000	-2,731	-1,474
					Stimul4l	-1.463	,196	,000	-2,091	-,834
				Stimul4g	Stimul1g	2.058	,196	,000	1,430	2,687
					Stimul1l	2.498	,196	,000	1,870	3,127
					Stimul2g	1.172	,196	,000	,543	1,800
					Stimul2l	1.519	,196	,000	,891	2,148
					Stimul3g	1.696	,196	,000	1,067	2,324
					Stimul3l	2.103	,196	,000	1,474	2,731
					Stimul4l	,640	,196	,042	,011	1,269
				Stimul4l	Stimul1g	1.418	,196	,000	,790	2,047
					Stimul1l	1.858	,196	,000	1,230	2,487
					Stimul2g	,532	,196	,219	-,097	1,160
					Stimul2l	,879	,196	,001	,251	1,508
					Stimul3g	1.056	,196	,000	,427	1,684
					Stimul3l	1.463	,196	,000	,834	2,091
					Stimul4g	-,640	,196	,042	-1,269	-,011
		CD8+TZ	0	Stimul1g	Stimul1l	,728	,196	,009	,100	1,357
					Stimul2g	-,133	,196	1,000	-,762	,495
					Stimul2l	,145	,196	1,000	-,484	,774
					Stimul3g	,330	,196	1,000	-,299	,959
					Stimul3l	,607	,196	,070	-,021	1,236
					Stimul4g	-,942	,196	,000	-1,570	-,313
					Stimul4l	-,505	,196	,318	-1,134	,124
				Stimul1l	Stimul1g	-,728	,196	,009	-1,357	-,100
					Stimul2g	-,862	,196	,001	-1,490	-,233
					Stimul2l	-,583	,196	,102	-1,212	,045
					Stimul3g	-,398	,196	1,000	-1,027	,230
					Stimul3l	-,121	,196	1,000	-,749	,508
					Stimul4g	-1.670	,196	,000	-2,299	-1,041

					Stimul4l	-1.233	,196	,000	-1,862	-,605
				Stimul2g	Stimul1g	,133	,196	1,000	-,495	,762
					Stimul1l	,862	,196	,001	,233	1,490
					Stimul2l	,278	,196	1,000	-,350	,907
					Stimul3g	,463	,196	,557	-,165	1,092
					Stimul3l	,741	,196	,007	,112	1,369
					Stimul4g	-,808	,196	,002	-1,437	-,180
					Stimul4l	-,372	,196	1,000	-1,000	,257
				Stimul2l	Stimul1g	-,145	,196	1,000	-,774	,484
					Stimul1l	,583	,196	,102	-,045	1,212
					Stimul2g	-,278	,196	1,000	-,907	,350
					Stimul3g	,185	,196	1,000	-,444	,814
					Stimul3l	,463	,196	,564	-,166	1,091
					Stimul4g	-1.087	,196	,000	-1,715	-,458
					Stimul4l	-,650	,196	,035	-1,279	-,021
				Stimul3g	Stimul1g	-,330	,196	1,000	-,959	,299
					Stimul1l	,398	,196	1,000	-,230	1,027
					Stimul2g	-,463	,196	,557	-1,092	,165
					Stimul2l	-,185	,196	1,000	-,814	,444
					Stimul3l	,278	,196	1,000	-,351	,906
					Stimul4g	-1.272	,196	,000	-1,900	-,643
					Stimul4l	-,835	,196	,001	-1,464	-,206
				Stimul3l	Stimul1g	-,607	,196	,070	-1,236	,021
					Stimul1l	,121	,196	1,000	-,508	,749
					Stimul2g	-,741	,196	,007	-1,369	-,112
					Stimul2l	-,463	,196	,564	-1,091	,166
					Stimul3g	-,278	,196	1,000	-,906	,351
					Stimul4g	-1.549	,196	,000	-2,178	-,921
					Stimul4l	-1.113	,196	,000	-1,741	-,484
				Stimul4g	Stimul1g	,942	,196	,000	,313	1,570
					Stimul1l	1.670	,196	,000	1,041	2,299
					Stimul2g	,808	,196	,002	,180	1,437
					Stimul2l	1.087	,196	,000	,458	1,715
					Stimul3g	1.272	,196	,000	,643	1,900
					Stimul3l	1.549	,196	,000	,921	2,178
					Stimul4l	,437	,196	,784	-,192	1,065
				Stimul4l	Stimul1g	,505	,196	,318	-,124	1,134
					Stimul1l	1.233	,196	,000	,605	1,862
					Stimul2g	,372	,196	1,000	-,257	1,000
					Stimul2l	,650	,196	,035	,021	1,279
					Stimul3g	,835	,196	,001	,206	1,464
					Stimul3l	1.113	,196	,000	,484	1,741
					Stimul4g	-,437	,196	,784	-1,065	,192
			5	Stimul1g	Stimul1l	,783	,196	,003	,155	1,412
					Stimul2g	-,121	,196	1,000	-,749	,508
					Stimul2l	,250	,196	1,000	-,379	,879
					Stimul3g	,388	,196	1,000	-,241	1,016
					Stimul3l	,625	,196	,053	-,004	1,254

					Stimul4g	-.919	,196	,000	-1,548	-,291
					Stimul4l	-,337	,196	1,000	-,966	,291
				Stimul1l	Stimul1g	-.783	,196	,003	-1,412	-,155
					Stimul2g	-.904	,196	,000	-1,533	-,276
					Stimul2l	-,533	,196	,213	-1,162	,095
					Stimul3g	-,396	,196	1,000	-1,024	,233
					Stimul3l	-,158	,196	1,000	-,787	,470
					Stimul4g	-1.703	,196	,000	-2,331	-1,074
					Stimul4l	-1.121	,196	,000	-1,749	-,492
				Stimul2g	Stimul1g	,121	,196	1,000	-,508	,749
					Stimul1l	,904	,196	,000	,276	1,533
					Stimul2l	,371	,196	1,000	-,258	,999
					Stimul3g	,508	,196	,304	-,120	1,137
					Stimul3l	,746	,196	,007	,117	1,374
					Stimul4g	-.798	,196	,003	-1,427	-,170
					Stimul4l	-,217	,196	1,000	-,845	,412
				Stimul2l	Stimul1g	-,250	,196	1,000	-,879	,379
					Stimul1l	,533	,196	,213	-,095	1,162
					Stimul2g	-,371	,196	1,000	-,999	,258
					Stimul3g	,138	,196	1,000	-,491	,766
					Stimul3l	,375	,196	1,000	-,254	1,004
					Stimul4g	-1.169	,196	,000	-1,798	-,541
					Stimul4l	-,587	,196	,095	-1,216	,041
				Stimul3g	Stimul1g	-,388	,196	1,000	-1,016	,241
					Stimul1l	,396	,196	1,000	-,233	1,024
					Stimul2g	-,508	,196	,304	-1,137	,120
					Stimul2l	-,138	,196	1,000	-,766	,491
					Stimul3l	,238	,196	1,000	-,391	,866
					Stimul4g	-1.307	,196	,000	-1,935	-,678
					Stimul4l	-.725	,196	,010	-1,354	-,096
				Stimul3l	Stimul1g	-,625	,196	,053	-1,254	,004
					Stimul1l	,158	,196	1,000	-,470	,787
					Stimul2g	-.746	,196	,007	-1,374	-,117
					Stimul2l	-,375	,196	1,000	-1,004	,254
					Stimul3g	-,238	,196	1,000	-,866	,391
					Stimul4g	-1.544	,196	,000	-2,173	-,916
					Stimul4l	-.963	,196	,000	-1,591	-,334
				Stimul4g	Stimul1g	,919	,196	,000	,291	1,548
					Stimul1l	1.703	,196	,000	1,074	2,331
					Stimul2g	,798	,196	,003	,170	1,427
					Stimul2l	1.169	,196	,000	,541	1,798
					Stimul3g	1.307	,196	,000	,678	1,935
					Stimul3l	1.544	,196	,000	,916	2,173
					Stimul4l	,582	,196	,104	-,047	1,210
				Stimul4l	Stimul1g	,337	,196	1,000	-,291	,966
					Stimul1l	1.121	,196	,000	,492	1,749
					Stimul2g	,217	,196	1,000	-,412	,845
					Stimul2l	,587	,196	,095	-,041	1,216

					Stimul3g	.725	,196	,010	,096	1,354
					Stimul3l	.963	,196	,000	,334	1,591
					Stimul4g	-.582	,196	,104	-1,210	,047
			40	Stimul1g	Stimul1l	.873	,196	,001	,245	1,502
					Stimul2g	,362	,196	1,000	-,267	,990
					Stimul2l	,602	,196	,076	-,026	1,231
					Stimul3g	.798	,196	,003	,169	1,426
					Stimul3l	.928	,196	,000	,299	1,556
					Stimul4g	-.347	,196	1,000	-,975	,282
					Stimul4l	,140	,196	1,000	-,489	,769
				Stimul1l	Stimul1g	-.873	,196	,001	-1,502	-,245
					Stimul2g	-.512	,196	,290	-1,140	,117
					Stimul2l	-.271	,196	1,000	-,899	,358
					Stimul3g	-,076	,196	1,000	-,704	,553
					Stimul3l	,054	,196	1,000	-,574	,683
					Stimul4g	-1.220	,196	,000	-1,849	-,591
					Stimul4l	-.733	,196	,008	-1,362	-,105
				Stimul2g	Stimul1g	-,362	,196	1,000	-,990	,267
					Stimul1l	,512	,196	,290	-,117	1,140
					Stimul2l	,241	,196	1,000	-,388	,869
					Stimul3g	,436	,196	,792	-,193	1,064
					Stimul3l	,566	,196	,132	-,063	1,194
					Stimul4g	-.708	,196	,013	-1,337	-,080
					Stimul4l	-,222	,196	1,000	-,850	,407
				Stimul2l	Stimul1g	-,602	,196	,076	-1,231	,026
					Stimul1l	,271	,196	1,000	-,358	,899
					Stimul2g	-,241	,196	1,000	-,869	,388
					Stimul3g	,195	,196	1,000	-,434	,824
					Stimul3l	,325	,196	1,000	-,304	,954
					Stimul4g	-.949	,196	,000	-1,578	-,321
					Stimul4l	-,462	,196	,564	-1,091	,166
				Stimul3g	Stimul1g	-.798	,196	,003	-1,426	-,169
					Stimul1l	,076	,196	1,000	-,553	,704
					Stimul2g	-,436	,196	,792	-1,064	,193
					Stimul2l	-,195	,196	1,000	-,824	,434
					Stimul3l	,130	,196	1,000	-,499	,759
					Stimul4g	-1.144	,196	,000	-1,773	-,516
					Stimul4l	-.658	,196	,031	-1,286	-,029
				Stimul3l	Stimul1g	-.928	,196	,000	-1,556	-,299
					Stimul1l	-,054	,196	1,000	-,683	,574
					Stimul2g	-,566	,196	,132	-1,194	,063
					Stimul2l	-,325	,196	1,000	-,954	,304
					Stimul3g	-,130	,196	1,000	-,759	,499
					Stimul4g	-1.274	,196	,000	-1,903	-,646
					Stimul4l	-.788	,196	,003	-1,416	-,159
				Stimul4g	Stimul1g	,347	,196	1,000	-,282	,975
					Stimul1l	1.220	,196	,000	,591	1,849
					Stimul2g	.708	,196	,013	,080	1,337

					Stimul2l	.949	,196	,000	,321	1,578
					Stimul3g	1.144	,196	,000	,516	1,773
					Stimul3l	1.274	,196	,000	,646	1,903
					Stimul4l	,487	,196	,409	-,142	1,115
				Stimul4l	Stimul1g	-,140	,196	1,000	-,769	,489
					Stimul1l	.733	,196	,008	,105	1,362
					Stimul2g	,222	,196	1,000	-,407	,850
					Stimul2l	,462	,196	,564	-,166	1,091
					Stimul3g	.658	,196	,031	,029	1,286
					Stimul3l	.788	,196	,003	,159	1,416
					Stimul4g	-,487	,196	,409	-1,115	,142
	Patient	CD3+TZ	0	Stimul1g	Stimul1l	,300	,196	1,000	-,329	,929
					Stimul2g	,078	,196	1,000	-,551	,706
					Stimul2l	,543	,196	,185	-,085	1,172
					Stimul3g	-,554	,196	,158	-1,183	,074
					Stimul3l	,207	,196	1,000	-,422	,835
					Stimul4g	-2.723	,196	,000	-3,352	-2,095
					Stimul4l	-2.127	,196	,000	-2,755	-1,498
				Stimul1l	Stimul1g	-,300	,196	1,000	-,929	,329
					Stimul2g	-,222	,196	1,000	-,851	,406
					Stimul2l	,243	,196	1,000	-,385	,872
					Stimul3g	-,854	,196	,001	-1,483	-,226
					Stimul3l	-,093	,196	1,000	-,722	,535
					Stimul4g	-3.023	,196	,000	-3,652	-2,395
					Stimul4l	-2.427	,196	,000	-3,055	-1,798
				Stimul2g	Stimul1g	-,078	,196	1,000	-,706	,551
					Stimul1l	,222	,196	1,000	-,406	,851
					Stimul2l	,466	,196	,540	-,163	1,094
					Stimul3g	-,632	,196	,048	-1,260	-,003
					Stimul3l	,129	,196	1,000	-,499	,758
					Stimul4g	-2.801	,196	,000	-3,429	-2,172
					Stimul4l	-2.204	,196	,000	-2,833	-1,576
				Stimul2l	Stimul1g	-,543	,196	,185	-1,172	,085
					Stimul1l	-,243	,196	1,000	-,872	,385
					Stimul2g	-,466	,196	,540	-1,094	,163
					Stimul3g	-1.098	,196	,000	-1,726	-,469
					Stimul3l	-,337	,196	1,000	-,965	,292
					Stimul4g	-3.267	,196	,000	-3,895	-2,638
					Stimul4l	-2.670	,196	,000	-3,299	-2,041
				Stimul3g	Stimul1g	,554	,196	,158	-,074	1,183
					Stimul1l	.854	,196	,001	,226	1,483
					Stimul2g	.632	,196	,048	,003	1,260
					Stimul2l	1.098	,196	,000	,469	1,726
					Stimul3l	.761	,196	,005	,132	1,389
					Stimul4g	-2.169	,196	,000	-2,798	-1,541
					Stimul4l	-1.573	,196	,000	-2,201	-,944
				Stimul3l	Stimul1g	-,207	,196	1,000	-,835	,422
					Stimul1l	,093	,196	1,000	-,535	,722

					Stimul2g	-,129	,196	1,000	-,758	,499
					Stimul2l	,337	,196	1,000	-,292	,965
					Stimul3g	-,761	,196	,005	-1,389	-,132
					Stimul4g	-2,930	,196	,000	-3,559	-2,301
					Stimul4l	-2,333	,196	,000	-2,962	-1,705
				Stimul4g	Stimul1g	2,723	,196	,000	2,095	3,352
					Stimul1l	3,023	,196	,000	2,395	3,652
					Stimul2g	2,801	,196	,000	2,172	3,429
					Stimul2l	3,267	,196	,000	2,638	3,895
					Stimul3g	2,169	,196	,000	1,541	2,798
					Stimul3l	2,930	,196	,000	2,301	3,559
					Stimul4l	,597	,196	,083	-,032	1,225
				Stimul4l	Stimul1g	2,127	,196	,000	1,498	2,755
					Stimul1l	2,427	,196	,000	1,798	3,055
					Stimul2g	2,204	,196	,000	1,576	2,833
					Stimul2l	2,670	,196	,000	2,041	3,299
					Stimul3g	1,573	,196	,000	,944	2,201
					Stimul3l	2,333	,196	,000	1,705	2,962
					Stimul4g	-,597	,196	,083	-1,225	,032
			5	Stimul1g	Stimul1l	,395	,196	1,000	-,234	1,024
					Stimul2g	-1,835	,196	,000	-2,464	-1,206
					Stimul2l	-1,764	,196	,000	-2,393	-1,136
					Stimul3g	-,609	,196	,068	-1,238	,019
					Stimul3l	,077	,196	1,000	-,552	,705
					Stimul4g	-2,696	,196	,000	-3,324	-2,067
					Stimul4l	-1,657	,196	,000	-2,285	-1,028
				Stimul1l	Stimul1g	-,395	,196	1,000	-1,024	,234
					Stimul2g	-2,230	,196	,000	-2,859	-1,601
					Stimul2l	-2,159	,196	,000	-2,788	-1,531
					Stimul3g	-1,004	,196	,000	-1,633	-,376
					Stimul3l	-,318	,196	1,000	-,947	,310
					Stimul4g	-3,091	,196	,000	-3,719	-2,462
					Stimul4l	-2,052	,196	,000	-2,680	-1,423
				Stimul2g	Stimul1g	1,835	,196	,000	1,206	2,464
					Stimul1l	2,230	,196	,000	1,601	2,859
					Stimul2l	,071	,196	1,000	-,558	,699
					Stimul3g	1,226	,196	,000	,597	1,854
					Stimul3l	1,912	,196	,000	1,283	2,540
					Stimul4g	-,861	,196	,001	-1,489	-,232
					Stimul4l	,178	,196	1,000	-,450	,807
				Stimul2l	Stimul1g	1,764	,196	,000	1,136	2,393
					Stimul1l	2,159	,196	,000	1,531	2,788
					Stimul2g	-,071	,196	1,000	-,699	,558
					Stimul3g	1,155	,196	,000	,526	1,784
					Stimul3l	1,841	,196	,000	1,212	2,469
					Stimul4g	-,932	,196	,000	-1,560	-,303
					Stimul4l	,108	,196	1,000	-,521	,736
				Stimul3g	Stimul1g	,609	,196	,068	-,019	1,238

					Stimul1l	1.004	,196	,000	,376	1,633
					Stimul2g	-1.226	,196	,000	-1,854	-,597
					Stimul2l	-1.155	,196	,000	-1,784	-,526
					Stimul3l	.686	,196	,019	,057	1,314
					Stimul4g	-2.087	,196	,000	-2,715	-1,458
					Stimul4l	-1.048	,196	,000	-1,676	-,419
				Stimul3l	Stimul1g	-,077	,196	1,000	-,705	,552
					Stimul1l	,318	,196	1,000	-,310	,947
					Stimul2g	-1.912	,196	,000	-2,540	-1,283
					Stimul2l	-1.841	,196	,000	-2,469	-1,212
					Stimul3g	-.686	,196	,019	-1,314	-,057
					Stimul4g	-2.773	,196	,000	-3,401	-2,144
					Stimul4l	-1.733	,196	,000	-2,362	-1,105
				Stimul4g	Stimul1g	2.696	,196	,000	2,067	3,324
					Stimul1l	3.091	,196	,000	2,462	3,719
					Stimul2g	.861	,196	,001	,232	1,489
					Stimul2l	.932	,196	,000	,303	1,560
					Stimul3g	2.087	,196	,000	1,458	2,715
					Stimul3l	2.773	,196	,000	2,144	3,401
					Stimul4l	1.039	,196	,000	,411	1,668
				Stimul4l	Stimul1g	1.657	,196	,000	1,028	2,285
					Stimul1l	2.052	,196	,000	1,423	2,680
					Stimul2g	-,178	,196	1,000	-,807	,450
					Stimul2l	-,108	,196	1,000	-,736	,521
					Stimul3g	1.048	,196	,000	,419	1,676
					Stimul3l	1.733	,196	,000	1,105	2,362
					Stimul4g	-1.039	,196	,000	-1,668	-,411
			40	Stimul1g	Stimul1l	,307	,196	1,000	-,321	,936
					Stimul2g	-2.023	,196	,000	-2,651	-1,394
					Stimul2l	-1.939	,196	,000	-2,568	-1,311
					Stimul3g	-,509	,196	,300	-1,138	,119
					Stimul3l	,204	,196	1,000	-,424	,833
					Stimul4g	-2.506	,196	,000	-3,134	-1,877
					Stimul4l	-1.354	,196	,000	-1,983	-,726
				Stimul1l	Stimul1g	-,307	,196	1,000	-,936	,321
					Stimul2g	-2.330	,196	,000	-2,959	-1,701
					Stimul2l	-2.247	,196	,000	-2,875	-1,618
					Stimul3g	-.817	,196	,002	-1,445	-,188
					Stimul3l	-,103	,196	1,000	-,732	,525
					Stimul4g	-2.813	,196	,000	-3,442	-2,185
					Stimul4l	-1.662	,196	,000	-2,290	-1,033
				Stimul2g	Stimul1g	2.023	,196	,000	1,394	2,651
					Stimul1l	2.330	,196	,000	1,701	2,959
					Stimul2l	,083	,196	1,000	-,545	,712
					Stimul3g	1.513	,196	,000	,885	2,142
					Stimul3l	2.227	,196	,000	1,598	2,855
					Stimul4g	-,483	,196	,428	-1,112	,145
					Stimul4l	.668	,196	,026	,040	1,297

				Stimul2l	Stimul1g	1.939	,196	,000	1,311	2,568
					Stimul1l	2.247	,196	,000	1,618	2,875
					Stimul2g	-,083	,196	1,000	-,712	,545
					Stimul3g	1.430	,196	,000	,801	2,059
					Stimul3l	2.143	,196	,000	1,515	2,772
					Stimul4g	-,567	,196	,131	-1,195	,062
					Stimul4l	,585	,196	,099	-,044	1,214
				Stimul3g	Stimul1g	,509	,196	,300	-,119	1,138
					Stimul1l	,817	,196	,002	,188	1,445
					Stimul2g	-1.513	,196	,000	-2,142	-,885
					Stimul2l	-1.430	,196	,000	-2,059	-,801
					Stimul3l	,713	,196	,012	,085	1,342
					Stimul4g	-1.997	,196	,000	-2,625	-1,368
					Stimul4l	-,845	,196	,001	-1,474	-,216
				Stimul3l	Stimul1g	-,204	,196	1,000	-,833	,424
					Stimul1l	,103	,196	1,000	-,525	,732
					Stimul2g	-2.227	,196	,000	-2,855	-1,598
					Stimul2l	-2.143	,196	,000	-2,772	-1,515
					Stimul3g	-,713	,196	,012	-1,342	-,085
					Stimul4g	-2.710	,196	,000	-3,339	-2,081
					Stimul4l	-1.558	,196	,000	-2,187	-,930
				Stimul4g	Stimul1g	2.506	,196	,000	1,877	3,134
					Stimul1l	2.813	,196	,000	2,185	3,442
					Stimul2g	,483	,196	,428	-,145	1,112
					Stimul2l	,567	,196	,131	-,062	1,195
					Stimul3g	1.997	,196	,000	1,368	2,625
					Stimul3l	2.710	,196	,000	2,081	3,339
					Stimul4l	1.152	,196	,000	,523	1,780
				Stimul4l	Stimul1g	1.354	,196	,000	,726	1,983
					Stimul1l	1.662	,196	,000	1,033	2,290
					Stimul2g	-,668	,196	,026	-1,297	-,040
					Stimul2l	-,585	,196	,099	-1,214	,044
					Stimul3g	,845	,196	,001	,216	1,474
					Stimul3l	1.558	,196	,000	,930	2,187
					Stimul4g	-1.152	,196	,000	-1,780	-,523
		CD8+TZ	0	Stimul1g	Stimul1l	,515	,196	,277	-,114	1,144
					Stimul2g	,484	,196	,423	-,144	1,113
					Stimul2l	,757	,196	,006	,128	1,385
					Stimul3g	-,009	,196	1,000	-,638	,619
					Stimul3l	,398	,196	1,000	-,230	1,027
					Stimul4g	-1.177	,196	,000	-1,805	-,548
					Stimul4l	-,785	,196	,003	-1,414	-,156
				Stimul1l	Stimul1g	-,515	,196	,277	-1,144	,114
					Stimul2g	-,031	,196	1,000	-,659	,598
					Stimul2l	,242	,196	1,000	-,387	,870
					Stimul3g	-,524	,196	,243	-1,153	,104
					Stimul3l	-,117	,196	1,000	-,745	,512
					Stimul4g	-1.692	,196	,000	-2,320	-1,063

					Stimul4l	-1.300	,196	,000	-1,929	-,671
				Stimul2g	Stimul1g	-,484	,196	,423	-1,113	,144
					Stimul1l	,031	,196	1,000	-,598	,659
					Stimul2l	,272	,196	1,000	-,356	,901
					Stimul3g	-,493	,196	,374	-1,122	,135
					Stimul3l	-,086	,196	1,000	-,714	,543
					Stimul4g	-1.661	,196	,000	-2,289	-1,032
					Stimul4l	-1.269	,196	,000	-1,898	-,641
				Stimul2l	Stimul1g	-,757	,196	,006	-1,385	-,128
					Stimul1l	-,242	,196	1,000	-,870	,387
					Stimul2g	-,272	,196	1,000	-,901	,356
					Stimul3g	-,766	,196	,005	-1,394	-,137
					Stimul3l	-,358	,196	1,000	-,987	,270
					Stimul4g	-1.933	,196	,000	-2,562	-1,305
					Stimul4l	-1.542	,196	,000	-2,170	-,913
				Stimul3g	Stimul1g	,009	,196	1,000	-,619	,638
					Stimul1l	,524	,196	,243	-,104	1,153
					Stimul2g	,493	,196	,374	-,135	1,122
					Stimul2l	,766	,196	,005	,137	1,394
					Stimul3l	,408	,196	1,000	-,221	1,036
					Stimul4g	-1.168	,196	,000	-1,796	-,539
					Stimul4l	-,776	,196	,004	-1,404	-,147
				Stimul3l	Stimul1g	-,398	,196	1,000	-1,027	,230
					Stimul1l	,117	,196	1,000	-,512	,745
					Stimul2g	,086	,196	1,000	-,543	,714
					Stimul2l	,358	,196	1,000	-,270	,987
					Stimul3g	-,408	,196	1,000	-1,036	,221
					Stimul4g	-1.575	,196	,000	-2,204	-,946
					Stimul4l	-1.183	,196	,000	-1,812	-,555
				Stimul4g	Stimul1g	1.177	,196	,000	,548	1,805
					Stimul1l	1.692	,196	,000	1,063	2,320
					Stimul2g	1.661	,196	,000	1,032	2,289
					Stimul2l	1.933	,196	,000	1,305	2,562
					Stimul3g	1.168	,196	,000	,539	1,796
					Stimul3l	1.575	,196	,000	,946	2,204
					Stimul4l	,392	,196	1,000	-,237	1,020
				Stimul4l	Stimul1g	,785	,196	,003	,156	1,414
					Stimul1l	1.300	,196	,000	,671	1,929
					Stimul2g	1.269	,196	,000	,641	1,898
					Stimul2l	1.542	,196	,000	,913	2,170
					Stimul3g	,776	,196	,004	,147	1,404
					Stimul3l	1.183	,196	,000	,555	1,812
					Stimul4g	-,392	,196	1,000	-1,020	,237
			5	Stimul1g	Stimul1l	,610	,196	,067	-,019	1,239
					Stimul2g	-1.428	,196	,000	-2,057	-,800
					Stimul2l	-1.551	,196	,000	-2,179	-,922
					Stimul3g	-,064	,196	1,000	-,693	,564
					Stimul3l	,268	,196	1,000	-,360	,897

					Stimul4g	-1.149	,196	,000	-1,778	-,521
					Stimul4l	-,315	,196	1,000	-,944	,314
				Stimul1l	Stimul1g	-,610	,196	,067	-1,239	,019
					Stimul2g	-2.038	,196	,000	-2,667	-1,410
					Stimul2l	-2.161	,196	,000	-2,789	-1,532
					Stimul3g	-,674	,196	,024	-1,303	-,046
					Stimul3l	-,342	,196	1,000	-,970	,287
					Stimul4g	-1.759	,196	,000	-2,388	-1,131
					Stimul4l	-,925	,196	,000	-1,554	-,296
				Stimul2g	Stimul1g	1.428	,196	,000	,800	2,057
					Stimul1l	2.038	,196	,000	1,410	2,667
					Stimul2l	-,123	,196	1,000	-,751	,506
					Stimul3g	1.364	,196	,000	,736	1,993
					Stimul3l	1.697	,196	,000	1,068	2,325
					Stimul4g	,279	,196	1,000	-,349	,908
					Stimul4l	1.113	,196	,000	,485	1,742
				Stimul2l	Stimul1g	1.551	,196	,000	,922	2,179
					Stimul1l	2.161	,196	,000	1,532	2,789
					Stimul2g	,123	,196	1,000	-,506	,751
					Stimul3g	1.487	,196	,000	,858	2,115
					Stimul3l	1.819	,196	,000	1,191	2,448
					Stimul4g	,402	,196	1,000	-,227	1,030
					Stimul4l	1.236	,196	,000	,607	1,864
				Stimul3g	Stimul1g	,064	,196	1,000	-,564	,693
					Stimul1l	,674	,196	,024	,046	1,303
					Stimul2g	-1.364	,196	,000	-1,993	-,736
					Stimul2l	-1.487	,196	,000	-2,115	-,858
					Stimul3l	,333	,196	1,000	-,296	,961
					Stimul4g	-1.085	,196	,000	-1,714	-,456
					Stimul4l	-,251	,196	1,000	-,879	,378
				Stimul3l	Stimul1g	-,268	,196	1,000	-,897	,360
					Stimul1l	,342	,196	1,000	-,287	,970
					Stimul2g	-1.697	,196	,000	-2,325	-1,068
					Stimul2l	-1.819	,196	,000	-2,448	-1,191
					Stimul3g	-,333	,196	1,000	-,961	,296
					Stimul4g	-1.418	,196	,000	-2,046	-,789
					Stimul4l	-,583	,196	,102	-1,212	,045
				Stimul4g	Stimul1g	1.149	,196	,000	,521	1,778
					Stimul1l	1.759	,196	,000	1,131	2,388
					Stimul2g	-,279	,196	1,000	-,908	,349
					Stimul2l	-,402	,196	1,000	-1,030	,227
					Stimul3g	1.085	,196	,000	,456	1,714
					Stimul3l	1.418	,196	,000	,789	2,046
					Stimul4l	,834	,196	,001	,206	1,463
				Stimul4l	Stimul1g	,315	,196	1,000	-,314	,944
					Stimul1l	,925	,196	,000	,296	1,554
					Stimul2g	-1.113	,196	,000	-1,742	-,485
					Stimul2l	-1.236	,196	,000	-1,864	-,607

					Stimul3g	,251	,196	1,000	-,378	,879
					Stimul3l	,583	,196	,102	-,045	1,212
					Stimul4g	-,834*	,196	,001	-1,463	-,206
			40	Stimul1g	Stimul1l	,522	,196	,249	-,106	1,151
					Stimul2g	-1.616*	,196	,000	-2,244	-,987
					Stimul2l	-1.726*	,196	,000	-2,354	-1,097
					Stimul3g	,036	,196	1,000	-,593	,664
					Stimul3l	,396	,196	1,000	-,233	1,024
					Stimul4g	-,959	,196	,000	-1,588	-,331
					Stimul4l	-,013	,196	1,000	-,641	,616
				Stimul1l	Stimul1g	-,522	,196	,249	-1,151	,106
					Stimul2g	-2.138	,196	,000	-2,767	-1,510
					Stimul2l	-2.248	,196	,000	-2,877	-1,620
					Stimul3g	-,487	,196	,409	-1,115	,142
					Stimul3l	-,127	,196	1,000	-,755	,502
					Stimul4g	-1.482	,196	,000	-2,110	-,853
					Stimul4l	-,535	,196	,208	-1,164	,094
				Stimul2g	Stimul1g	1.616*	,196	,000	,987	2,244
					Stimul1l	2.138*	,196	,000	1,510	2,767
					Stimul2l	-,110	,196	1,000	-,739	,519
					Stimul3g	1.652	,196	,000	1,023	2,280
					Stimul3l	2.012	,196	,000	1,383	2,640
					Stimul4g	,657	,196	,032	,028	1,285
					Stimul4l	1.603*	,196	,000	,975	2,232
				Stimul2l	Stimul1g	1.726*	,196	,000	1,097	2,354
					Stimul1l	2.248*	,196	,000	1,620	2,877
					Stimul2g	,110	,196	1,000	-,519	,739
					Stimul3g	1.762	,196	,000	1,133	2,390
					Stimul3l	2.122	,196	,000	1,493	2,750
					Stimul4g	,767*	,196	,005	,138	1,395
					Stimul4l	1.713*	,196	,000	1,085	2,342
				Stimul3g	Stimul1g	-,036	,196	1,000	-,664	,593
					Stimul1l	,487	,196	,409	-,142	1,115
					Stimul2g	-1.652*	,196	,000	-2,280	-1,023
					Stimul2l	-1.762*	,196	,000	-2,390	-1,133
					Stimul3l	,360	,196	1,000	-,269	,989
					Stimul4g	-,995*	,196	,000	-1,624	-,366
					Stimul4l	-,048	,196	1,000	-,677	,580
				Stimul3l	Stimul1g	-,396	,196	1,000	-1,024	,233
					Stimul1l	,127	,196	1,000	-,502	,755
					Stimul2g	-2.012*	,196	,000	-2,640	-1,383
					Stimul2l	-2.122*	,196	,000	-2,750	-1,493
					Stimul3g	-,360	,196	1,000	-,989	,269
					Stimul4g	-1.355	,196	,000	-1,984	-,726
					Stimul4l	-,408	,196	1,000	-1,037	,220
				Stimul4g	Stimul1g	,959*	,196	,000	,331	1,588
					Stimul1l	1.482*	,196	,000	,853	2,110
					Stimul2g	-,657*	,196	,032	-1,285	-,028

					Stimul2l	-.767*	,196	,005	-1,395	-,138
					Stimul3g	,995*	,196	,000	,366	1,624
					Stimul3l	1.355*	,196	,000	,726	1,984
					Stimul4l	,947*	,196	,000	,318	1,575
				Stimul4l	Stimul1g	,013	,196	1,000	-,616	,641
					Stimul1l	,535	,196	,208	-,094	1,164
					Stimul2g	-1.603	,196	,000	-2,232	-,975
					Stimul2l	-1.713	,196	,000	-2,342	-1,085
					Stimul3g	,048	,196	1,000	-,580	,677
					Stimul3l	,408	,196	1,000	-,220	1,037
					Stimul4g	-.947*	,196	,000	-1,575	-,318
nach 48h Stimulation	Spender	CD3+TZ	0	Stimul1g	Stimul1l	,222	,196	1,000	-,407	,850
					Stimul2g	-1.217*	,196	,000	-1,845	-,588
					Stimul2l	-.795*	,196	,003	-1,424	-,166
					Stimul3g	-1.130*	,196	,000	-1,759	-,501
					Stimul3l	-,233	,196	1,000	-,861	,396
					Stimul4g	-2.508	,196	,000	-3,137	-1,880
					Stimul4l	-1.595*	,196	,000	-2,224	-,966
				Stimul1l	Stimul1g	-,222	,196	1,000	-,850	,407
					Stimul2g	-1.438*	,196	,000	-2,067	-,810
					Stimul2l	-1.017*	,196	,000	-1,645	-,388
					Stimul3g	-1.352*	,196	,000	-1,980	-,723
					Stimul3l	-,454	,196	,628	-1,083	,174
					Stimul4g	-2.730*	,196	,000	-3,359	-2,101
					Stimul4l	-1.817*	,196	,000	-2,445	-1,188
				Stimul2g	Stimul1g	1.217*	,196	,000	,588	1,845
					Stimul1l	1.438	,196	,000	,810	2,067
					Stimul2l	,422	,196	,944	-,207	1,050
					Stimul3g	,087	,196	1,000	-,542	,715
					Stimul3l	,984	,196	,000	,356	1,613
					Stimul4g	-1.292	,196	,000	-1,920	-,663
					Stimul4l	-,378	,196	1,000	-1,007	,250
				Stimul2l	Stimul1g	,795*	,196	,003	,166	1,424
					Stimul1l	1.017*	,196	,000	,388	1,645
					Stimul2g	-,422	,196	,944	-1,050	,207
					Stimul3g	-,335	,196	1,000	-,964	,294
					Stimul3l	,563	,196	,139	-,066	1,191
					Stimul4g	-1.713	,196	,000	-2,342	-1,085
					Stimul4l	-.800*	,196	,002	-1,429	-,171
				Stimul3g	Stimul1g	1.130*	,196	,000	,501	1,759
					Stimul1l	1.352*	,196	,000	,723	1,980
					Stimul2g	-,087	,196	1,000	-,715	,542
					Stimul2l	,335	,196	1,000	-,294	,964
					Stimul3l	,898	,196	,000	,269	1,526
					Stimul4g	-1.378	,196	,000	-2,007	-,750
					Stimul4l	-,465	,196	,545	-1,094	,164
				Stimul3l	Stimul1g	,233	,196	1,000	-,396	,861

					Stimul1l	,454	,196	,628	-,174	1,083
					Stimul2g	-.984	,196	,000	-1,613	-,356
					Stimul2l	-.563	,196	,139	-1,191	,066
					Stimul3g	-.898	,196	,000	-1,526	-,269
					Stimul4g	-2.276	,196	,000	-2,904	-1,647
					Stimul4l	-1.363	,196	,000	-1,991	-,734
				Stimul4g	Stimul1g	2.508	,196	,000	1,880	3,137
					Stimul1l	2.730	,196	,000	2,101	3,359
					Stimul2g	1.292	,196	,000	,663	1,920
					Stimul2l	1.713	,196	,000	1,085	2,342
					Stimul3g	1.378	,196	,000	,750	2,007
					Stimul3l	2.276	,196	,000	1,647	2,904
					Stimul4l	,913	,196	,000	,285	1,542
				Stimul4l	Stimul1g	1.595	,196	,000	,966	2,224
					Stimul1l	1.817	,196	,000	1,188	2,445
					Stimul2g	,378	,196	1,000	-,250	1,007
					Stimul2l	,800	,196	,002	,171	1,429
					Stimul3g	,465	,196	,545	-,164	1,094
					Stimul3l	1.363	,196	,000	,734	1,991
					Stimul4g	-.913	,196	,000	-1,542	-,285
			5	Stimul1g	Stimul1l	,277	,196	1,000	-,352	,905
					Stimul2g	-1.204	,196	,000	-1,833	-,576
					Stimul2l	-.690	,196	,018	-1,319	-,061
					Stimul3g	-1.073	,196	,000	-1,701	-,444
					Stimul3l	-,215	,196	1,000	-,844	,414
					Stimul4g	-2.486	,196	,000	-3,114	-1,857
					Stimul4l	-1.428	,196	,000	-2,056	-,799
				Stimul1l	Stimul1g	-,277	,196	1,000	-,905	,352
					Stimul2g	-1.481	,196	,000	-2,109	-,852
					Stimul2l	-.967	,196	,000	-1,595	-,338
					Stimul3g	-1.349	,196	,000	-1,978	-,721
					Stimul3l	-,492	,196	,382	-1,120	,137
					Stimul4g	-2.763	,196	,000	-3,391	-2,134
					Stimul4l	-1.704	,196	,000	-2,333	-1,076
				Stimul2g	Stimul1g	1.204	,196	,000	,576	1,833
					Stimul1l	1.481	,196	,000	,852	2,109
					Stimul2l	,514	,196	,280	-,114	1,143
					Stimul3g	,132	,196	1,000	-,497	,760
					Stimul3l	,989	,196	,000	,361	1,618
					Stimul4g	-1.282	,196	,000	-1,910	-,653
					Stimul4l	-,223	,196	1,000	-,852	,405
				Stimul2l	Stimul1g	,690	,196	,018	,061	1,319
					Stimul1l	,967	,196	,000	,338	1,595
					Stimul2g	-,514	,196	,280	-1,143	,114
					Stimul3g	-,382	,196	1,000	-1,011	,246
					Stimul3l	,475	,196	,478	-,154	1,104
					Stimul4g	-1.796	,196	,000	-2,424	-1,167
					Stimul4l	-,738	,196	,008	-1,366	-,109

				Stimul3g	Stimul1g	1.073	,196	,000	,444	1,701
					Stimul1l	1.349	,196	,000	,721	1,978
					Stimul2g	-,132	,196	1,000	-,760	,497
					Stimul2l	,382	,196	1,000	-,246	1,011
					Stimul3l	,858	,196	,001	,229	1,486
					Stimul4g	-1.413	,196	,000	-2,042	-,785
					Stimul4l	-,355	,196	1,000	-,984	,274
				Stimul3l	Stimul1g	,215	,196	1,000	-,414	,844
					Stimul1l	,492	,196	,382	-,137	1,120
					Stimul2g	-,989	,196	,000	-1,618	-,361
					Stimul2l	-,475	,196	,478	-1,104	,154
					Stimul3g	-,858	,196	,001	-1,486	-,229
					Stimul4g	-2.271	,196	,000	-2,899	-1,642
					Stimul4l	-1.213	,196	,000	-1,841	-,584
				Stimul4g	Stimul1g	2.486	,196	,000	1,857	3,114
					Stimul1l	2.763	,196	,000	2,134	3,391
					Stimul2g	1.282	,196	,000	,653	1,910
					Stimul2l	1.796	,196	,000	1,167	2,424
					Stimul3g	1.413	,196	,000	,785	2,042
					Stimul3l	2.271	,196	,000	1,642	2,899
					Stimul4l	1.058	,196	,000	,430	1,687
				Stimul4l	Stimul1g	1.428	,196	,000	,799	2,056
					Stimul1l	1.704	,196	,000	1,076	2,333
					Stimul2g	,223	,196	1,000	-,405	,852
					Stimul2l	,738	,196	,008	,109	1,366
					Stimul3g	,355	,196	1,000	-,274	,984
					Stimul3l	1.213	,196	,000	,584	1,841
					Stimul4g	-1.058	,196	,000	-1,687	-,430
			40	Stimul1g	Stimul1l	,367	,196	1,000	-,262	,995
					Stimul2g	-,722	,196	,010	-1,350	-,093
					Stimul2l	-,338	,196	1,000	-,966	,291
					Stimul3g	-,663	,196	,029	-1,291	-,034
					Stimul3l	,088	,196	1,000	-,541	,716
					Stimul4g	-1.913	,196	,000	-2,542	-1,285
					Stimul4l	-,950	,196	,000	-1,579	-,321
				Stimul1l	Stimul1g	-,367	,196	1,000	-,995	,262
					Stimul2g	-1.088	,196	,000	-1,717	-,460
					Stimul2l	-,704	,196	,014	-1,333	-,076
					Stimul3g	-1.029	,196	,000	-1,658	-,401
					Stimul3l	-,279	,196	1,000	-,908	,349
					Stimul4g	-2.280	,196	,000	-2,909	-1,651
					Stimul4l	-1.317	,196	,000	-1,945	-,688
				Stimul2g	Stimul1g	,722	,196	,010	,093	1,350
					Stimul1l	1.088	,196	,000	,460	1,717
					Stimul2l	,384	,196	1,000	-,244	1,013
					Stimul3g	,059	,196	1,000	-,569	,688
					Stimul3l	,809	,196	,002	,181	1,438
					Stimul4g	-1.192	,196	,000	-1,820	-,563

					Stimul4l	-,228	,196	1,000	-,857	,400
				Stimul2l	Stimul1g	,338	,196	1,000	-,291	,966
					Stimul1l	,704*	,196	,014	,076	1,333
					Stimul2g	-,384	,196	1,000	-1,013	,244
					Stimul3g	-,325	,196	1,000	-,954	,304
					Stimul3l	,425	,196	,906	-,204	1,054
					Stimul4g	-1.576	,196	,000	-2,204	-,947
					Stimul4l	-,613	,196	,065	-1,241	,016
				Stimul3g	Stimul1g	,663	,196	,029	,034	1,291
					Stimul1l	1.029*	,196	,000	,401	1,658
					Stimul2g	-,059	,196	1,000	-,688	,569
					Stimul2l	,325	,196	1,000	-,304	,954
					Stimul3l	,750	,196	,006	,121	1,379
					Stimul4g	-1.251*	,196	,000	-1,879	-,622
					Stimul4l	-,288	,196	1,000	-,916	,341
				Stimul3l	Stimul1g	-,088	,196	1,000	-,716	,541
					Stimul1l	,279	,196	1,000	-,349	,908
					Stimul2g	-,809*	,196	,002	-1,438	-,181
					Stimul2l	-,425	,196	,906	-1,054	,204
					Stimul3g	-,750	,196	,006	-1,379	-,121
					Stimul4g	-2.001*	,196	,000	-2,629	-1,372
					Stimul4l	-1.038	,196	,000	-1,666	-,409
				Stimul4g	Stimul1g	1.913	,196	,000	1,285	2,542
					Stimul1l	2.280*	,196	,000	1,651	2,909
					Stimul2g	1.192*	,196	,000	,563	1,820
					Stimul2l	1.576*	,196	,000	,947	2,204
					Stimul3g	1.251*	,196	,000	,622	1,879
					Stimul3l	2.001*	,196	,000	1,372	2,629
					Stimul4l	,963	,196	,000	,335	1,592
				Stimul4l	Stimul1g	,950*	,196	,000	,321	1,579
					Stimul1l	1.317*	,196	,000	,688	1,945
					Stimul2g	,228	,196	1,000	-,400	,857
					Stimul2l	,613	,196	,065	-,016	1,241
					Stimul3g	,288	,196	1,000	-,341	,916
					Stimul3l	1.038*	,196	,000	,409	1,666
					Stimul4g	-,963	,196	,000	-1,592	-,335
		CD8+TZ	0	Stimul1g	Stimul1l	,655*	,196	,032	,026	1,284
					Stimul2g	,032	,196	1,000	-,597	,660
					Stimul2l	,347	,196	1,000	-,282	,975
					Stimul3g	,030	,196	1,000	-,599	,659
					Stimul3l	,651*	,196	,035	,022	1,279
					Stimul4g	-,797*	,196	,003	-1,425	-,168
					Stimul4l	-,037	,196	1,000	-,665	,592
				Stimul1l	Stimul1g	-,655	,196	,032	-1,284	-,026
					Stimul2g	-,623	,196	,054	-1,252	,005
					Stimul2l	-,308	,196	1,000	-,937	,320
					Stimul3g	-,625	,196	,053	-1,254	,004
					Stimul3l	-,004	,196	1,000	-,633	,624

					Stimul4g	-1.452*	,196	,000	-2,080	-,823
					Stimul4l	-.692*	,196	,017	-1,320	-,063
				Stimul2g	Stimul1g	-,032	,196	1,000	-,660	,597
					Stimul1l	,623	,196	,054	-,005	1,252
					Stimul2l	,315	,196	1,000	-,314	,944
					Stimul3g	-,002	,196	1,000	-,630	,627
					Stimul3l	,619	,196	,058	-,009	1,248
					Stimul4g	-.828*	,196	,001	-1,457	-,200
					Stimul4l	-,068	,196	1,000	-,697	,560
				Stimul2l	Stimul1g	-,347	,196	1,000	-,975	,282
					Stimul1l	,308	,196	1,000	-,320	,937
					Stimul2g	-,315	,196	1,000	-,944	,314
					Stimul3g	-,317	,196	1,000	-,945	,312
					Stimul3l	,304	,196	1,000	-,324	,933
					Stimul4g	-1.143	,196	,000	-1,772	-,515
					Stimul4l	-,383	,196	1,000	-1,012	,245
				Stimul3g	Stimul1g	-,030	,196	1,000	-,659	,599
					Stimul1l	,625	,196	,053	-,004	1,254
					Stimul2g	,002	,196	1,000	-,627	,630
					Stimul2l	,317	,196	1,000	-,312	,945
					Stimul3l	,621	,196	,057	-,008	1,249
					Stimul4g	-.827*	,196	,001	-1,455	-,198
					Stimul4l	-,067	,196	1,000	-,695	,562
				Stimul3l	Stimul1g	-.651*	,196	,035	-1,279	-,022
					Stimul1l	,004	,196	1,000	-,624	,633
					Stimul2g	-,619	,196	,058	-1,248	,009
					Stimul2l	-,304	,196	1,000	-,933	,324
					Stimul3g	-,621	,196	,057	-1,249	,008
					Stimul4g	-1.448	,196	,000	-2,076	-,819
					Stimul4l	-.688*	,196	,019	-1,316	-,059
				Stimul4g	Stimul1g	,797*	,196	,003	,168	1,425
					Stimul1l	1.452*	,196	,000	,823	2,080
					Stimul2g	,828*	,196	,001	,200	1,457
					Stimul2l	1.143*	,196	,000	,515	1,772
					Stimul3g	,827*	,196	,001	,198	1,455
					Stimul3l	1.448	,196	,000	,819	2,076
					Stimul4l	,760*	,196	,005	,131	1,389
				Stimul4l	Stimul1g	,037	,196	1,000	-,592	,665
					Stimul1l	,692*	,196	,017	,063	1,320
					Stimul2g	,068	,196	1,000	-,560	,697
					Stimul2l	,383	,196	1,000	-,245	1,012
					Stimul3g	,067	,196	1,000	-,562	,695
					Stimul3l	,688*	,196	,019	,059	1,316
					Stimul4g	-.760*	,196	,005	-1,389	-,131
			5	Stimul1g	Stimul1l	,710*	,196	,013	,081	1,339
					Stimul2g	,044	,196	1,000	-,584	,673
					Stimul2l	,452	,196	,648	-,177	1,080
					Stimul3g	,087	,196	1,000	-,541	,716

					Stimul3l	.668	,196	,026	,040	1,297
					Stimul4g	-.774	,196	,004	-1,403	-,146
					Stimul4l	,131	,196	1,000	-,498	,759
				Stimul1l	Stimul1g	-.710	,196	,013	-1,339	-,081
					Stimul2g	-.666	,196	,027	-1,294	-,037
					Stimul2l	-.258	,196	1,000	-,887	,370
					Stimul3g	-.623	,196	,055	-1,251	,006
					Stimul3l	-.042	,196	1,000	-,670	,587
					Stimul4g	-1.484	,196	,000	-2,113	-,856
					Stimul4l	-.579	,196	,108	-1,208	,049
				Stimul2g	Stimul1g	-.044	,196	1,000	-,673	,584
					Stimul1l	.666	,196	,027	,037	1,294
					Stimul2l	,407	,196	1,000	-,221	1,036
					Stimul3g	,043	,196	1,000	-,585	,672
					Stimul3l	,624	,196	,054	-,004	1,253
					Stimul4g	-.818	,196	,002	-1,447	-,190
					Stimul4l	,087	,196	1,000	-,542	,715
				Stimul2l	Stimul1g	-.452	,196	,648	-1,080	,177
					Stimul1l	,258	,196	1,000	-,370	,887
					Stimul2g	-.407	,196	1,000	-1,036	,221
					Stimul3g	-.364	,196	1,000	-,993	,264
					Stimul3l	,217	,196	1,000	-,412	,845
					Stimul4g	-1.226	,196	,000	-1,854	-,597
					Stimul4l	-.321	,196	1,000	-,949	,308
				Stimul3g	Stimul1g	-.087	,196	1,000	-,716	,541
					Stimul1l	,623	,196	,055	-,006	1,251
					Stimul2g	-.043	,196	1,000	-,672	,585
					Stimul2l	,364	,196	1,000	-,264	,993
					Stimul3l	,581	,196	,106	-,048	1,209
					Stimul4g	-.862	,196	,001	-1,490	-,233
					Stimul4l	,043	,196	1,000	-,585	,672
				Stimul3l	Stimul1g	-.668	,196	,026	-1,297	-,040
					Stimul1l	,042	,196	1,000	-,587	,670
					Stimul2g	-.624	,196	,054	-1,253	,004
					Stimul2l	-.217	,196	1,000	-,845	,412
					Stimul3g	-.581	,196	,106	-1,209	,048
					Stimul4g	-1.443	,196	,000	-2,071	-,814
					Stimul4l	-.537	,196	,201	-1,166	,091
				Stimul4g	Stimul1g	.774	,196	,004	,146	1,403
					Stimul1l	1.484	,196	,000	,856	2,113
					Stimul2g	.818	,196	,002	,190	1,447
					Stimul2l	1.226	,196	,000	,597	1,854
					Stimul3g	.862	,196	,001	,233	1,490
					Stimul3l	1.443	,196	,000	,814	2,071
					Stimul4l	.905	,196	,000	,276	1,534
				Stimul4l	Stimul1g	-,131	,196	1,000	-,759	,498
					Stimul1l	,579	,196	,108	-,049	1,208
					Stimul2g	-.087	,196	1,000	-,715	,542

					Stimul2l	,321	,196	1,000	-,308	,949
					Stimul3g	-,043	,196	1,000	-,672	,585
					Stimul3l	,537	,196	,201	-,091	1,166
					Stimul4g	-,905	,196	,000	-1,534	-,276
			40	Stimul1g	Stimul1l	,800	,196	,002	,171	1,429
					Stimul2g	,527	,196	,235	-,102	1,155
					Stimul2l	,804	,196	,002	,176	1,433
					Stimul3g	,497	,196	,353	-,131	1,126
					Stimul3l	,971	,196	,000	,342	1,599
					Stimul4g	-,202	,196	1,000	-,830	,427
					Stimul4l	,608	,196	,069	-,020	1,237
				Stimul1l	Stimul1g	-,800	,196	,002	-1,429	-,171
					Stimul2g	-,273	,196	1,000	-,902	,355
					Stimul2l	,004	,196	1,000	-,624	,633
					Stimul3g	-,303	,196	1,000	-,931	,326
					Stimul3l	,171	,196	1,000	-,458	,799
					Stimul4g	-1.002	,196	,000	-1,630	-,373
					Stimul4l	-,192	,196	1,000	-,820	,437
				Stimul2g	Stimul1g	-,527	,196	,235	-1,155	,102
					Stimul1l	,273	,196	1,000	-,355	,902
					Stimul2l	,277	,196	1,000	-,351	,906
					Stimul3g	-,029	,196	1,000	-,658	,599
					Stimul3l	,444	,196	,713	-,184	1,073
					Stimul4g	-,728	,196	,009	-1,357	-,100
					Stimul4l	,082	,196	1,000	-,547	,710
				Stimul2l	Stimul1g	-,804	,196	,002	-1,433	-,176
					Stimul1l	-,004	,196	1,000	-,633	,624
					Stimul2g	-,277	,196	1,000	-,906	,351
					Stimul3g	-,307	,196	1,000	-,935	,322
					Stimul3l	,167	,196	1,000	-,462	,795
					Stimul4g	-1.006	,196	,000	-1,634	-,377
					Stimul4l	-,196	,196	1,000	-,824	,433
				Stimul3g	Stimul1g	-,497	,196	,353	-1,126	,131
					Stimul1l	,303	,196	1,000	-,326	,931
					Stimul2g	,029	,196	1,000	-,599	,658
					Stimul2l	,307	,196	1,000	-,322	,935
					Stimul3l	,473	,196	,489	-,155	1,102
					Stimul4g	-,699	,196	,015	-1,328	-,071
					Stimul4l	,111	,196	1,000	-,518	,739
				Stimul3l	Stimul1g	-,971	,196	,000	-1,599	-,342
					Stimul1l	-,171	,196	1,000	-,799	,458
					Stimul2g	-,444	,196	,713	-1,073	,184
					Stimul2l	-,167	,196	1,000	-,795	,462
					Stimul3g	-,473	,196	,489	-1,102	,155
					Stimul4g	-1.173	,196	,000	-1,801	-,544
					Stimul4l	-,362	,196	1,000	-,991	,266
				Stimul4g	Stimul1g	,202	,196	1,000	-,427	,830
					Stimul1l	1.002	,196	,000	,373	1,630

					Stimul2g	.728	,196	,009	,100	1,357
					Stimul2l	1.006	,196	,000	,377	1,634
					Stimul3g	.699	,196	,015	,071	1,328
					Stimul3l	1.173	,196	,000	,544	1,801
					Stimul4l	.810	,196	,002	,181	1,439
				Stimul4l	Stimul1g	-.608	,196	,069	-1,237	,020
					Stimul1l	,192	,196	1,000	-,437	,820
					Stimul2g	-,082	,196	1,000	-,710	,547
					Stimul2l	,196	,196	1,000	-,433	,824
					Stimul3g	-,111	,196	1,000	-,739	,518
					Stimul3l	,362	,196	1,000	-,266	,991
					Stimul4g	-.810	,196	,002	-1,439	-,181
	Patient	CD3+TZ	0	Stimul1g	Stimul1l	,375	,196	1,000	-,254	1,004
					Stimul2g	-,289	,196	1,000	-,918	,339
					Stimul2l	,283	,196	1,000	-,345	,912
					Stimul3g	-.716	,196	,011	-1,344	-,087
					Stimul3l	,292	,196	1,000	-,337	,920
					Stimul4g	-2.873	,196	,000	-3,502	-2,245
					Stimul4l	-1.925	,196	,000	-2,554	-1,296
				Stimul1l	Stimul1g	-,375	,196	1,000	-1,004	,254
					Stimul2g	-.664	,196	,028	-1,293	-,036
					Stimul2l	-,092	,196	1,000	-,720	,537
					Stimul3g	-1.091	,196	,000	-1,719	-,462
					Stimul3l	-,083	,196	1,000	-,712	,545
					Stimul4g	-3.248	,196	,000	-3,877	-2,620
					Stimul4l	-2.300	,196	,000	-2,929	-1,671
				Stimul2g	Stimul1g	,289	,196	1,000	-,339	,918
					Stimul1l	.664	,196	,028	,036	1,293
					Stimul2l	,572	,196	,120	-,056	1,201
					Stimul3g	-,427	,196	,888	-1,055	,202
					Stimul3l	,581	,196	,106	-,048	1,209
					Stimul4g	-2.584	,196	,000	-3,213	-1,956
					Stimul4l	-1.636	,196	,000	-2,264	-1,007
				Stimul2l	Stimul1g	-,283	,196	1,000	-,912	,345
					Stimul1l	,092	,196	1,000	-,537	,720
					Stimul2g	-,572	,196	,120	-1,201	,056
					Stimul3g	-.999	,196	,000	-1,628	-,371
					Stimul3l	,008	,196	1,000	-,620	,637
					Stimul4g	-3.157	,196	,000	-3,785	-2,528
					Stimul4l	-2.208	,196	,000	-2,837	-1,580
				Stimul3g	Stimul1g	.716	,196	,011	,087	1,344
					Stimul1l	1.091	,196	,000	,462	1,719
					Stimul2g	,427	,196	,888	-,202	1,055
					Stimul2l	.999	,196	,000	,371	1,628
					Stimul3l	1.008	,196	,000	,379	1,636
					Stimul4g	-2.158	,196	,000	-2,786	-1,529
					Stimul4l	-1.209	,196	,000	-1,838	-,581
				Stimul3l	Stimul1g	-,292	,196	1,000	-,920	,337

					Stimul1l	,083	,196	1,000	-,545	,712
					Stimul2g	-,581	,196	,106	-1,209	,048
					Stimul2l	-,008	,196	1,000	-,637	,620
					Stimul3g	-1.008	,196	,000	-1,636	-,379
					Stimul4g	-3.165	,196	,000	-3,794	-2,536
					Stimul4l	-2.217	,196	,000	-2,845	-1,588
				Stimul4g	Stimul1g	2.873	,196	,000	2,245	3,502
					Stimul1l	3.248	,196	,000	2,620	3,877
					Stimul2g	2.584	,196	,000	1,956	3,213
					Stimul2l	3.157	,196	,000	2,528	3,785
					Stimul3g	2.158	,196	,000	1,529	2,786
					Stimul3l	3.165	,196	,000	2,536	3,794
					Stimul4l	,948	,196	,000	,320	1,577
				Stimul4l	Stimul1g	1.925	,196	,000	1,296	2,554
					Stimul1l	2.300	,196	,000	1,671	2,929
					Stimul2g	1.636	,196	,000	1,007	2,264
					Stimul2l	2.208	,196	,000	1,580	2,837
					Stimul3g	1.209	,196	,000	,581	1,838
					Stimul3l	2.217	,196	,000	1,588	2,845
					Stimul4g	-,948	,196	,000	-1,577	-,320
			5	Stimul1g	Stimul1l	,470	,196	,511	-,159	1,099
					Stimul2g	-2.202	,196	,000	-2,830	-1,573
					Stimul2l	-2.024	,196	,000	-2,653	-1,396
					Stimul3g	-,771	,196	,004	-1,399	-,142
					Stimul3l	,162	,196	1,000	-,467	,790
					Stimul4g	-2.846	,196	,000	-3,474	-2,217
					Stimul4l	-1.455	,196	,000	-2,084	-,826
				Stimul1l	Stimul1g	-,470	,196	,511	-1,099	,159
					Stimul2g	-2.672	,196	,000	-3,300	-2,043
					Stimul2l	-2.494	,196	,000	-3,123	-1,866
					Stimul3g	-1.241	,196	,000	-1,869	-,612
					Stimul3l	-,308	,196	1,000	-,937	,320
					Stimul4g	-3.316	,196	,000	-3,944	-2,687
					Stimul4l	-1.925	,196	,000	-2,554	-1,296
				Stimul2g	Stimul1g	2.202	,196	,000	1,573	2,830
					Stimul1l	2.672	,196	,000	2,043	3,300
					Stimul2l	,177	,196	1,000	-,451	,806
					Stimul3g	1.431	,196	,000	,802	2,059
					Stimul3l	2.363	,196	,000	1,735	2,992
					Stimul4g	-,644	,196	,039	-1,273	-,016
					Stimul4l	,747	,196	,007	,118	1,375
				Stimul2l	Stimul1g	2.024	,196	,000	1,396	2,653
					Stimul1l	2.494	,196	,000	1,866	3,123
					Stimul2g	-,177	,196	1,000	-,806	,451
					Stimul3g	1.253	,196	,000	,625	1,882
					Stimul3l	2.186	,196	,000	1,557	2,814
					Stimul4g	-,822	,196	,002	-1,450	-,193
					Stimul4l	,569	,196	,126	-,059	1,198

				Stimul3g	Stimul1g	.771*	,196	,004	,142	1,399
					Stimul1l	1.241*	,196	,000	,612	1,869
					Stimul2g	-1.431*	,196	,000	-2,059	-,802
					Stimul2l	-1.253*	,196	,000	-1,882	-,625
					Stimul3l	.933*	,196	,000	,304	1,561
					Stimul4g	-2.075*	,196	,000	-2,704	-1,446
					Stimul4l	-.684	,196	,020	-1,313	-,056
				Stimul3l	Stimul1g	-,162	,196	1,000	-,790	,467
					Stimul1l	,308	,196	1,000	-,320	,937
					Stimul2g	-2.363*	,196	,000	-2,992	-1,735
					Stimul2l	-2.186*	,196	,000	-2,814	-1,557
					Stimul3g	-.933	,196	,000	-1,561	-,304
					Stimul4g	-3.008	,196	,000	-3,636	-2,379
					Stimul4l	-1.617*	,196	,000	-2,245	-,988
				Stimul4g	Stimul1g	2.846	,196	,000	2,217	3,474
					Stimul1l	3.316*	,196	,000	2,687	3,944
					Stimul2g	.644*	,196	,039	,016	1,273
					Stimul2l	.822*	,196	,002	,193	1,450
					Stimul3g	2.075*	,196	,000	1,446	2,704
					Stimul3l	3.008	,196	,000	2,379	3,636
					Stimul4l	1.391	,196	,000	,762	2,019
				Stimul4l	Stimul1g	1.455*	,196	,000	,826	2,084
					Stimul1l	1.925	,196	,000	1,296	2,554
					Stimul2g	-.747*	,196	,007	-1,375	-,118
					Stimul2l	-.569	,196	,126	-1,198	,059
					Stimul3g	.684*	,196	,020	,056	1,313
					Stimul3l	1.617*	,196	,000	,988	2,245
					Stimul4g	-1.391	,196	,000	-2,019	-,762
			40	Stimul1g	Stimul1l	,382	,196	1,000	-,246	1,011
					Stimul2g	-2.389*	,196	,000	-3,018	-1,761
					Stimul2l	-2.199*	,196	,000	-2,828	-1,571
					Stimul3g	-.671*	,196	,025	-1,299	-,042
					Stimul3l	,289	,196	1,000	-,339	,918
					Stimul4g	-2.656*	,196	,000	-3,284	-2,027
					Stimul4l	-1.153*	,196	,000	-1,781	-,524
				Stimul1l	Stimul1g	-,382	,196	1,000	-1,011	,246
					Stimul2g	-2.772*	,196	,000	-3,400	-2,143
					Stimul2l	-2.582*	,196	,000	-3,210	-1,953
					Stimul3g	-1.053*	,196	,000	-1,682	-,425
					Stimul3l	-,093	,196	1,000	-,722	,535
					Stimul4g	-3.038*	,196	,000	-3,667	-2,410
					Stimul4l	-1.535*	,196	,000	-2,164	-,906
				Stimul2g	Stimul1g	2.389*	,196	,000	1,761	3,018
					Stimul1l	2.772*	,196	,000	2,143	3,400
					Stimul2l	,190	,196	1,000	-,439	,819
					Stimul3g	1.718*	,196	,000	1,090	2,347
					Stimul3l	2.678*	,196	,000	2,050	3,307
					Stimul4g	-,267	,196	1,000	-,895	,362

					Stimul4l	1.237	,196	,000	,608	1,865
				Stimul2l	Stimul1g	2.199	,196	,000	1,571	2,828
					Stimul1l	2.582	,196	,000	1,953	3,210
					Stimul2g	-,190	,196	1,000	-,819	,439
					Stimul3g	1.528	,196	,000	,900	2,157
					Stimul3l	2.488	,196	,000	1,860	3,117
					Stimul4g	-,457	,196	,608	-1,085	,172
					Stimul4l	1.047	,196	,000	,418	1,675
				Stimul3g	Stimul1g	,671	,196	,025	,042	1,299
					Stimul1l	1.053	,196	,000	,425	1,682
					Stimul2g	-1.718	,196	,000	-2,347	-1,090
					Stimul2l	-1.528	,196	,000	-2,157	-,900
					Stimul3l	,960	,196	,000	,331	1,589
					Stimul4g	-1.985	,196	,000	-2,614	-1,356
					Stimul4l	-,482	,196	,437	-1,110	,147
				Stimul3l	Stimul1g	-,289	,196	1,000	-,918	,339
					Stimul1l	,093	,196	1,000	-,535	,722
					Stimul2g	-2.678	,196	,000	-3,307	-2,050
					Stimul2l	-2.488	,196	,000	-3,117	-1,860
					Stimul3g	-,960	,196	,000	-1,589	-,331
					Stimul4g	-2.945	,196	,000	-3,574	-2,316
					Stimul4l	-1.442	,196	,000	-2,070	-,813
				Stimul4g	Stimul1g	2.656	,196	,000	2,027	3,284
					Stimul1l	3.038	,196	,000	2,410	3,667
					Stimul2g	,267	,196	1,000	-,362	,895
					Stimul2l	,457	,196	,608	-,172	1,085
					Stimul3g	1.985	,196	,000	1,356	2,614
					Stimul3l	2.945	,196	,000	2,316	3,574
					Stimul4l	1.503	,196	,000	,875	2,132
				Stimul4l	Stimul1g	1.153	,196	,000	,524	1,781
					Stimul1l	1.535	,196	,000	,906	2,164
					Stimul2g	-1.237	,196	,000	-1,865	-,608
					Stimul2l	-1.047	,196	,000	-1,675	-,418
					Stimul3g	,482	,196	,437	-,147	1,110
					Stimul3l	1.442	,196	,000	,813	2,070
					Stimul4g	-1.503	,196	,000	-2,132	-,875
		CD8+TZ	0	Stimul1g	Stimul1l	,590	,196	,092	-,039	1,219
					Stimul2g	,117	,196	1,000	-,511	,746
					Stimul2l	,497	,196	,357	-,132	1,125
					Stimul3g	-,171	,196	1,000	-,799	,458
					Stimul3l	,483	,196	,428	-,145	1,112
					Stimul4g	-1.327	,196	,000	-1,955	-,698
					Stimul4l	-,583	,196	,102	-1,212	,045
				Stimul1l	Stimul1g	-,590	,196	,092	-1,219	,039
					Stimul2g	-,473	,196	,494	-1,101	,156
					Stimul2l	-,093	,196	1,000	-,722	,535
					Stimul3g	-,761	,196	,005	-1,389	-,132
					Stimul3l	-,107	,196	1,000	-,735	,522

					Stimul4g	-1.917*	,196	,000	-2,545	-1,288
					Stimul4l	-1.173*	,196	,000	-1,802	-,545
				Stimul2g	Stimul1g	-,117	,196	1,000	-,746	,511
					Stimul1l	,473	,196	,494	-,156	1,101
					Stimul2l	,379	,196	1,000	-,249	1,008
					Stimul3g	-,288	,196	1,000	-,917	,340
					Stimul3l	,366	,196	1,000	-,263	,994
					Stimul4g	-1.444*	,196	,000	-2,073	-,816
					Stimul4l	-,701	,196	,015	-1,329	-,072
				Stimul2l	Stimul1g	-,497	,196	,357	-1,125	,132
					Stimul1l	,093	,196	1,000	-,535	,722
					Stimul2g	-,379	,196	1,000	-1,008	,249
					Stimul3g	-,668	,196	,026	-1,296	-,039
					Stimul3l	-,013	,196	1,000	-,642	,615
					Stimul4g	-1.823	,196	,000	-2,452	-1,195
					Stimul4l	-1.080*	,196	,000	-1,709	-,451
				Stimul3g	Stimul1g	,171	,196	1,000	-,458	,799
					Stimul1l	,761*	,196	,005	,132	1,389
					Stimul2g	,288	,196	1,000	-,340	,917
					Stimul2l	,668	,196	,026	,039	1,296
					Stimul3l	,654	,196	,033	,026	1,283
					Stimul4g	-1.156*	,196	,000	-1,784	-,527
					Stimul4l	-,413	,196	1,000	-1,041	,216
				Stimul3l	Stimul1g	-,483	,196	,428	-1,112	,145
					Stimul1l	,107	,196	1,000	-,522	,735
					Stimul2g	-,366	,196	1,000	-,994	,263
					Stimul2l	,013	,196	1,000	-,615	,642
					Stimul3g	-,654	,196	,033	-1,283	-,026
					Stimul4g	-1.810	,196	,000	-2,439	-1,181
					Stimul4l	-1.067*	,196	,000	-1,695	-,438
				Stimul4g	Stimul1g	1.327*	,196	,000	,698	1,955
					Stimul1l	1.917*	,196	,000	1,288	2,545
					Stimul2g	1.444*	,196	,000	,816	2,073
					Stimul2l	1.823*	,196	,000	1,195	2,452
					Stimul3g	1.156*	,196	,000	,527	1,784
					Stimul3l	1.810	,196	,000	1,181	2,439
					Stimul4l	,743*	,196	,007	,115	1,372
				Stimul4l	Stimul1g	,583	,196	,102	-,045	1,212
					Stimul1l	1.173*	,196	,000	,545	1,802
					Stimul2g	,701*	,196	,015	,072	1,329
					Stimul2l	1.080*	,196	,000	,451	1,709
					Stimul3g	,413	,196	1,000	-,216	1,041
					Stimul3l	1.067*	,196	,000	,438	1,695
					Stimul4g	-,743	,196	,007	-1,372	-,115
			5	Stimul1g	Stimul1l	,685*	,196	,020	,056	1,314
					Stimul2g	-1.795*	,196	,000	-2,424	-1,166
					Stimul2l	-1.811*	,196	,000	-2,439	-1,182
					Stimul3g	-,226	,196	1,000	-,854	,403

					Stimul3l	,353	,196	1,000	-,275	,982
					Stimul4g	-1.299	,196	,000	-1,928	-,671
					Stimul4l	-,113	,196	1,000	-,742	,515
				Stimul1l	Stimul1g	-.685	,196	,020	-1,314	-,056
					Stimul2g	-2.480	,196	,000	-3,109	-1,851
					Stimul2l	-2.496	,196	,000	-3,124	-1,867
					Stimul3g	-.911	,196	,000	-1,539	-,282
					Stimul3l	-,332	,196	1,000	-,960	,297
					Stimul4g	-1.984	,196	,000	-2,613	-1,356
					Stimul4l	-.798	,196	,003	-1,427	-,170
				Stimul2g	Stimul1g	1.795	,196	,000	1,166	2,424
					Stimul1l	2.480	,196	,000	1,851	3,109
					Stimul2l	-,016	,196	1,000	-,644	,613
					Stimul3g	1.569	,196	,000	,941	2,198
					Stimul3l	2.148	,196	,000	1,520	2,777
					Stimul4g	,496	,196	,361	-,133	1,124
					Stimul4l	1.682	,196	,000	1,053	2,310
				Stimul2l	Stimul1g	1.811	,196	,000	1,182	2,439
					Stimul1l	2.496	,196	,000	1,867	3,124
					Stimul2g	,016	,196	1,000	-,613	,644
					Stimul3g	1.585	,196	,000	,956	2,214
					Stimul3l	2.164	,196	,000	1,536	2,793
					Stimul4g	,512	,196	,290	-,117	1,140
					Stimul4l	1.698	,196	,000	1,069	2,326
				Stimul3g	Stimul1g	,226	,196	1,000	-,403	,854
					Stimul1l	,911	,196	,000	,282	1,539
					Stimul2g	-1.569	,196	,000	-2,198	-,941
					Stimul2l	-1.585	,196	,000	-2,214	-,956
					Stimul3l	,579	,196	,108	-,049	1,208
					Stimul4g	-1.073	,196	,000	-1,702	-,445
					Stimul4l	,112	,196	1,000	-,516	,741
				Stimul3l	Stimul1g	-,353	,196	1,000	-,982	,275
					Stimul1l	,332	,196	1,000	-,297	,960
					Stimul2g	-2.148	,196	,000	-2,777	-1,520
					Stimul2l	-2.164	,196	,000	-2,793	-1,536
					Stimul3g	-,579	,196	,108	-1,208	,049
					Stimul4g	-1.653	,196	,000	-2,281	-1,024
					Stimul4l	-,467	,196	,534	-1,095	,162
				Stimul4g	Stimul1g	1.299	,196	,000	,671	1,928
					Stimul1l	1.984	,196	,000	1,356	2,613
					Stimul2g	-,496	,196	,361	-1,124	,133
					Stimul2l	-,512	,196	,290	-1,140	,117
					Stimul3g	1.073	,196	,000	,445	1,702
					Stimul3l	1.653	,196	,000	1,024	2,281
					Stimul4l	1.186	,196	,000	,557	1,814
				Stimul4l	Stimul1g	,113	,196	1,000	-,515	,742
					Stimul1l	,798	,196	,003	,170	1,427
					Stimul2g	-1.682	,196	,000	-2,310	-1,053

					Stimul2l	-1.698*	,196	,000	-2,326	-1,069
					Stimul3g	-,112	,196	1,000	-,741	,516
					Stimul3l	,467	,196	,534	-,162	1,095
					Stimul4g	-1.186*	,196	,000	-1,814	-,557
			40	Stimul1g	Stimul1l	,597	,196	,082	-,031	1,226
					Stimul2g	-1.983*	,196	,000	-2,611	-1,354
					Stimul2l	-1.986*	,196	,000	-2,614	-1,357
					Stimul3g	-,126	,196	1,000	-,754	,503
					Stimul3l	,481	,196	,442	-,148	1,109
					Stimul4g	-1.109*	,196	,000	-1,738	-,481
					Stimul4l	,189	,196	1,000	-,439	,818
				Stimul1l	Stimul1g	-,597	,196	,082	-1,226	,031
					Stimul2g	-2.580*	,196	,000	-3,209	-1,951
					Stimul2l	-2.583*	,196	,000	-3,212	-1,955
					Stimul3g	-,723	,196	,010	-1,352	-,095
					Stimul3l	-,117	,196	1,000	-,745	,512
					Stimul4g	-1.707*	,196	,000	-2,335	-1,078
					Stimul4l	-,408	,196	1,000	-1,037	,220
				Stimul2g	Stimul1g	1.983*	,196	,000	1,354	2,611
					Stimul1l	2.580*	,196	,000	1,951	3,209
					Stimul2l	-,003	,196	1,000	-,632	,625
					Stimul3g	1.857*	,196	,000	1,228	2,485
					Stimul3l	2.463*	,196	,000	1,835	3,092
					Stimul4g	,873*	,196	,001	,245	1,502
					Stimul4l	2.172*	,196	,000	1,543	2,800
				Stimul2l	Stimul1g	1.986*	,196	,000	1,357	2,614
					Stimul1l	2.583*	,196	,000	1,955	3,212
					Stimul2g	,003	,196	1,000	-,625	,632
					Stimul3g	1.860*	,196	,000	1,231	2,489
					Stimul3l	2.467*	,196	,000	1,838	3,095
					Stimul4g	,877*	,196	,001	,248	1,505
					Stimul4l	2.175*	,196	,000	1,546	2,804
				Stimul3g	Stimul1g	,126	,196	1,000	-,503	,754
					Stimul1l	,723*	,196	,010	,095	1,352
					Stimul2g	-1.857*	,196	,000	-2,485	-1,228
					Stimul2l	-1.860*	,196	,000	-2,489	-1,231
					Stimul3l	,607	,196	,071	-,022	1,235
					Stimul4g	-,983*	,196	,000	-1,612	-,355
					Stimul4l	,315	,196	1,000	-,314	,944
				Stimul3l	Stimul1g	-,481	,196	,442	-1,109	,148
					Stimul1l	,117	,196	1,000	-,512	,745
					Stimul2g	-2.463*	,196	,000	-3,092	-1,835
					Stimul2l	-2.467*	,196	,000	-3,095	-1,838
					Stimul3g	-,607	,196	,071	-1,235	,022
					Stimul4g	-1.590*	,196	,000	-2,219	-,961
					Stimul4l	-,292	,196	1,000	-,920	,337
				Stimul4g	Stimul1g	1.109*	,196	,000	,481	1,738
					Stimul1l	1.707*	,196	,000	1,078	2,335

					Stimul2g	-,873	,196	,001	-1,502	-,245
					Stimul2l	-,877	,196	,001	-1,505	-,248
					Stimul3g	,983	,196	,000	,355	1,612
					Stimul3l	1,590	,196	,000	,961	2,219
					Stimul4l	1,298	,196	,000	,670	1,927
				Stimul4l	Stimul1g	-,189	,196	1,000	-,818	,439
					Stimul1l	,408	,196	1,000	-,220	1,037
					Stimul2g	-2,172	,196	,000	-2,800	-1,543
					Stimul2l	-2,175	,196	,000	-2,804	-1,546
					Stimul3g	-,315	,196	1,000	-,944	,314
					Stimul3l	,292	,196	1,000	-,337	,920
					Stimul4g	-1,298	,196	,000	-1,927	-,670

8.3 Univariate Tests

nach 24h Stimulation	Spender	CD3+TZ	0	Contrast	17,374	7	2,482	53,915	,000
				Error	4,649	101	,046		
			5	Contrast	16,798	7	2,400	52,128	,000
				Error	4,649	101	,046		
			40	Contrast	11,508	7	1,644	35,714	,000
				Error	4,649	101	,046		
		CD8+TZ	0	Contrast	5,238	7	,748	16,254	,000
				Error	4,649	101	,046		
			5	Contrast	5,123	7	,732	15,897	,000
				Error	4,649	101	,046		
			40	Contrast	3,564	7	,509	11,059	,000
				Error	4,649	101	,046		
	Patient	CD3+TZ	0	Contrast	24,946	7	3,564	77,413	,000
				Error	4,649	101	,046		
			5	Contrast	21,229	7	3,033	65,878	,000
				Error	4,649	101	,046		
			40	Contrast	20,921	7	2,989	64,922	,000
				Error	4,649	101	,046		
		CD8+TZ	0	Contrast	7,746	7	1,107	24,038	,000
				Error	4,649	101	,046		
			5	Contrast	11,201	7	1,600	34,758	,000
				Error	4,649	101	,046		
			40	Contrast	13,272	7	1,896	41,187	,000
				Error	4,649	101	,046		
nach 48h Stimulation	Spender	CD3+TZ	0	Contrast	13,793	7	1,970	42,805	,000
				Error	4,649	101	,046		
			5	Contrast	13,452	7	1,922	41,745	,000
				Error	4,649	101	,046		
			40	Contrast	8,751	7	1,250	27,155	,000
				Error	4,649	101	,046		
		CD8+TZ	0	Contrast	3,633	7	,519	11,274	,000
				Error	4,649	101	,046		
			5	Contrast	3,753	7	,536	11,645	,000
				Error	4,649	101	,046		
			40	Contrast	2,782	7	,397	8,632	,000
				Error	4,649	101	,046		
	Patient	CD3+TZ	0	Contrast	23,806	7	3,401	73,877	,000
				Error	4,649	101	,046		
			5	Contrast	25,475	7	3,639	79,055	,000
				Error	4,649	101	,046		
			40	Contrast	25,908	7	3,701	80,398	,000
				Error	4,649	101	,046		
		CD8+TZ	0	Contrast	7,086	7	1,012	21,989	,000
				Error	4,649	101	,046		
			5	Contrast	15,926	7	2,275	49,422	,000
				Error	4,649	101	,046		

			40	Contrast	18,738	7	2,677	58,149	,000
				Error	4,649	101	,046		

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AG	Antigen
AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
AP	Alkalische Phosphatase
APZ	Antigen präsentierende Zellen
B7.1	CD80
B7-H1	Human B7 homolog 1
B1-1	Bax inhibitor-1
BAGE	B melanoma antigene
BSA	Bovines Serum Albumin
BZ	B-Lymphozyt
CBF	Core binding factor
CD	Cluster of differentiation
CDK	Cyclin abhängige Kinase
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CML	Chronische myeloische Leukämie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DUSP 12	Dual spezifizierte Proteinphosphatase
DZ	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
FAB	French-American-British
FACS	Fluorescence activated Cellsortening
FADD	FAS associated death domain

FCS	Fetal calv serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GAGE	G Antigen
GVH	Graft versus host
GMCSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
H&E	Hämatoxilin Eosin
HER2/NEU	Human epidermal growth Receptor 2
HIV	Humanes Immundefiziens-Virus
HLA	Human leukocyte Antigen
HPV	Humanes Papilloma Virus
HZ	Hybridzellen
IDO	Indoleamin 2,3-Dioxygenase
IL	Interleukin
INF	Interferon
KLH	Keyhole-limpet-homocystein
LAK	Lymphokin aktivierte Lymphozyten
LLC	Lewis lung carcinoma
LMP 1	Latentes Membran Protein 1
MAGE	Melanoma antigen gene
MHC	Major histocompatibility Complex
MRD	Minimal residual disease
MYH	Myosin heavy chain
NKZ	Natürliche Killerzelle
PBMC	Mononukleären Zellen
PCR	Polymerase Kettenreaktion

PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PS	Penicillin/ Streptomycin
RAB	Ras related Protein
RNS	Ribonukleinsäure
SZ	Standartzellen
SCF	Stemcellfactor
SCID	Severe combined Immundeficiency
s.o.	Siehe oben
TAA	Tumor assoziierte Antigene
TBCE	Tubulin spezifisches Chaperon E
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TH	T-Helferzellen
TIL	Tumorerinfiltrierende T-lymphozyten
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL	TNF verbundener Apoptose induzierender Ligand
TRP	Tyrosinase related Protein
TZ	T-Lymphozyten
XIAP	X-linked Protein IAP
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ZTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
ZTLA	TZ-assoziiertes Antigen-4

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung Fusionsverfahren	26
Abbildung 2: Zeitlicher Verlauf des 1. Heilungsversuchs.....	36
Abbildung 3: Zeitlicher Verlauf des 2. Heilungsversuchs.....	37
Abbildung 4: FACS-Bilder zur Kontrolle der Fusionsrate.....	39
Abbildung 5: Proliferative Aktivität gesunder Spender-TZ als Reaktion auf auf Fusionsprodukte aus den Spender-DZ und inv(16)-positiven AML-Zellen.	42
Abbildung 6: Proliferative Aktivität gesunder Spender-TZ als Reaktion auf verschiedene Stimulatorzellen. Als HZ dienten Fusionsprodukte aus DZ eines inv(16)- positiven AML- Patienten und inv(16)-positiven AML-Zellen..	42
Abbildung 7: Proliferative Aktivität gesunder Spender-TZ als Reaktion auf Fusionsprodukte aus DZ eines inv(16)-positiven AML-Patienten und autologen sowie allogenen inv(16)-positiven AML-Zellen.	43
Abbildung 8: Proliferative Aktivität gesunder Spender-TZ als Reaktion auf Fusionsprodukte aus DZ eines inv(16)-positiven AML-Patienten und inv(16)-positiven sowie inv(16)-negativen Zellen.....	43
Abbildung 9: Proliferative Aktivität von TZ von inv(16)-positiven Patienten als Reaktion auf Fusionsprodukte aus DZ des inv(16)-positiven AML-Patienten (HLA- A24) und autologen sowie allogenen AML inv(16)-Zellen.	45
Abbildung 10: Proliferative Aktivität von TZ von inv(16)-positiven AML-Patienten als Reaktion auf Fusionsprodukte aus DZ der Patienten und allogenen sowie autologen inv(16)-positiven AML-Zellen.....	46
Abbildung 11: Proliferative Aktivität von TZ von AML inv(16)-Patienten als Reaktion auf Fusionsprodukte aus diesen DZ eines AML inv(16)-Patienten und AML inv(16) positiven Zellen sowie AML inv(16) negativen Zellen.....	46
Abbildung 12: Proliferative Aktivität von CD3-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen vor Vakzinierung nach 24h.....	49
Abbildung 13:Proliferative Aktivität von CD3-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen vor Vakzinierung nach 48h.....	49
Abbildung 14: Proliferative Aktivität von CD8-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen	

vor Vakzinierung nach 24h.....	51
Abbildung 15: Proliferative Aktivität von CD8-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen vor Vakzinierung nach 48h.....	51
Abbildung 16: Proliferative Aktivität von CD3-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen nach Vakzinierung nach 24h.....	53
Abbildung 17: Proliferative Aktivität von CD3-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen nach Vakzinierung nach 48h.....	53
Abbildung 18: Proliferative Aktivität von CD8-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen nach Vakzinierung nach 24h.....	55
Abbildung 19: Proliferative Aktivität von CD8-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen nach Vakzinierung nach 48h.....	55
Abbildung 20: Proliferative Aktivität von CD3-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen vor Vakzinierung nach 24h.....	58
Abbildung 21: Proliferative Aktivität von CD3-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen vor Vakzinierung nach 48h.....	58
Abbildung 22: Proliferative Aktivität von CD8-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen vor Vakzinierung nach 24h.....	60
Abbildung 23: Proliferative Aktivität von CD8-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen vor Vakzinierung nach 48h.....	60
Abbildung 24: Proliferative Aktivität von CD3-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen nach Vakzinierung nach 24h.....	62
Abbildung 25: Proliferative Aktivität von CD3-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen	

nach Vakzinierung nach 48h.....	62
Abbildung 26: Proliferative Aktivität von CD8-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen nach Vakzinierung nach 24h.....	64
Abbildung 27: Proliferative Aktivität von CD8-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen nach Vakzinierung nach 48h.....	64
Abbildung 28: Proliferative Aktivität von CD3-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen 40 Tage nach Vakzinierung nach 24h.....	66
Abbildung 29: Proliferative Aktivität von CD3-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen 40 Tage nach Vakzinierung nach 48h.....	66
Abbildung 30: Proliferative Aktivität von CD8-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen 40 Tage nach Vakzinierung nach 24h.....	68
Abbildung 31: Proliferative Aktivität von CD8-positiven TZ der AML inv(16)-Patientin und des gesunden Spenders als Reaktion auf verschiedene, bestrahlte Stimulatorzellen 40 Tage nach Vakzinierung nach 48h.....	68
Abbildung 32 Die Ergebnisse der beiden Heilungsversuche im zeitlichen Verlauf.....	77

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: FAB-Klassifikation.....	2
Tabelle 2: Geräte	14
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien	15
Tabelle 4: Medien und Puffer	16
Tabelle 5: Zelllinien.....	17
Tabelle 6: Reagenzien, Zytokine und Antibiotika	18
Tabelle 7: Antikörper und Färbungen.....	19
Tabelle 8: Molekularbiologische Reagenzien	20
Tabelle 9: Primer	21

12 Literaturverzeichnis

1. Albert, M.L., Sauter, B., Bhardwaj, N.: Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, (1998), S.86-89.
2. Amoralia, P.J., Reid, S.D., Gao, L. et al.: Allorestricted cytotoxic T cells specific for human CD45 show potent antileukemic activity. *Blood* 101, (2003), S.1007-1014.
3. Antony, P.A., Piccirillo, C.A., Akpınarlı, A., Finkelstein, S.E., Speiss, P.J., Surman, D.R., Palmer, D.C., Chan, C.C., Klebanoff, C.A., Overwijk, W.W., Rosenberg, S.A., Restifo, N.P.: CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *Journal of Immunology* 174, (2005), S. 2591-25601.
4. Avivi, I., Rowe, J.M.: Prognostic factors in acute myeloid leukaemia. *Curr Opin Hematol* 12, (2004), S. 62-67.
5. Baer, M.R., George, S.L., Caligiuri, M.A. et al.: Low-dose interleukin-2 immunotherapy does not improve outcome outcome of patients age 60 years and older with acute myeloid leukemia in first complete remission: Cancer and leukemia in first complete remission: Cancer and leukemia group B Study 9720. *J Clin Oncol* 26, (2008), S. 4934-4939.
6. Banat, G.A., Usluoglu, N., Hoeck, M., Ihlo, K., Hoppmann, S., Pralle, H.: Dendritic cells fused with core binding factor-beta positive acute myeloid leukaemia blast cells induce activation of cytotoxic lymphocytes. *Br J Haematol* 126, (2004), S. 593-601.
7. Banat, G.A., Ihlow, K., Usluoglu, N., Hoppmann, S., Hoeck, M., Pralle, H.: Core-binding factor-beta positive acute myeloid leukaemia cells induce T-cell responses. *Br J Haematol* 123, (2003), S. 819-29.

8. Barrett, A.J., Blank, K.L.: Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect. *Br J Haematol.* 142, (2008), S.877-888.
9. Barrett, A.J., Savani, B.N.: Does chemotherapy modify the immune surveillance of hematological malignancies? *Leukemia* 23, (2009), S. 53–58.
10. Beckhove, P. et al.: Specifically activated memory T-cells subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. *J. Clin. Invest.* 114, (2004), S. 67-76.
11. Ben-Hur, H., Ben-Meir, A., Hagay, Z., Ben-Meir, A., Berman, V., Schwartzburd, B., Gurevich, P., Sandler, B., Tendler, Y., Zinder, O., Zusman, I.: Tumor-preventive effects of the soluble p53 antigen on chemically-induced skin cancer in mice. *Anticancer Res* 18, (1998), S. 4237-4241.
12. Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., Sultan, C.: Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 33, (1976), S. 451-458
13. Biernacki, M.A., Marina, O., Zhang, W., Liu, F., Bruns, I., Cai, A., Neuberg, D., Canning, C.M., Alyea, E.P., Soiffer, R.J., Brusic, V., Ritz, J., Wu, C.J.: Efficacious immune therapy in chronic myelogenous leukemia (CML) recognizes antigens that are expressed on CML progenitor cells. *Cancer Res.* 70, (2010), S. 906-915.
14. Bocchia, M., Gentili, S., Abruzzese, E., Fanelli, A., Iuliano, F., Tabilio, A., Amabile, M., Forconi, F., Gozzetti, A., Raspadori, D., Amadori, S., Lauria, F.: Effect of a p210 multi-peptide vaccine associated with imatinib or interferon in patients with chronic myeloid leukaemia and persistent residual disease: a multicentre observational trial. *Lancet* 365, (2005), S. 657-662.
15. Borrello, I.M., Levitsky, H.I., Stock, W. et al.: Granulocyte-macrophage colony-

- stimulating factor (GM-CSF)-secreting cellular immunotherapy in combination with autologous stem cell transplantation (ASCT) as postremission therapy for acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 114, (2009), S. 1736–1745.
16. Boshoff, C., Weiss, R.: AIDS-related malignancies. *Nat. Rev. Cancer* 5, (2002), S. 378-382.
 17. Britos-Bray, M., Romirez, M., Cao, W., Wang, X., Liu, P.P., Civiu, C.L., Friedmann, A.D.: CBFbeta-SMMHC, expressed in M4eo acute myeloid leucemia, reduced p53 induction and slows apoptosis in hematopoietic cells expose to DNA-damaging agents. *Blood* 92, (1998), S. 4344-4352.
 18. Brugger, W., Schneider, A., Schammann, T., Dill, P., Grünebach, F., Bühring, H.J., Kanz, L., Brossart, P.: Dendritic cell-based vakzines in patients with hematological malignancies. *Ann N Y Acad Sci* 938, (2001), S. 359-362.
 19. Bullinger, L., Rücker, F.G., Kurz, S., Du, J., Scholl, C., Sander, S., Corbacioglu, A., Lottaz, C., Krauter, J., Fröhling, S., Ganser, A., Schlenk, R.F., Döhner, K., Pollack, J.R., Döhner, H.: Gene-expression profiling identifies distinct subclasses of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* 110, (2007), S. 1291-1300.
 20. Burnett, F.M.: The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, (1970), S. 1-27.
 21. Castilla, L.H., Wijmenga, C., Wang, Q., Stacy, T., Speck, N.A., Eckhaus, M., Marín-Padilla, M., Collins, F.S., Wynshaw-Boris, A., Liu, P.P.: Failure of Embryonic Hematopoiesis and Lethal Hemorrhages in Mouse Embryos Heterozygous for a Knocked-In Leukemia Gene CBFB-MYH11. *Cell* 87, (1996), S. 687-696.
 22. Cathcart, K., Pinilla-Ibarz, J., Korontsvit, T., Schwartz, J., Zakhaleva, V., Papadopoulos, E.B., Scheinberg, D.A.: A multivalent bcr-abl fusion peptide vakzination trial in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 103, (2004),

1037-1042.

23. Chan, L., Hardwick N., Darling, D., et al.: IL-2/B7.1 (CD80) fusagene transduction of AML blasts by a self-inactivating lentiviral vector stimulates T cell responses in vitro: A strategy to generate whole cell vaccines for AML. *Mol Ther* 11, (2005), S. 120-131.
24. Chen, M.L., Pittet, M.J., Gorelik, L., Flavell, R.A., Weissleder, R., von Boehmer, H., Khazaie, K.: Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, (2005), S. 419-424.
25. Claxton, D., Choudhury, A.: Potential for therapy with AML-derived dendritic cells. *Leukemia* 15, (2001), S. 668-669.
26. De Angulo, G., Yuen, C., Palla, S.L., Anderson, P.M., Zweidler-McKay, P.A.: Absolute lymphocyte count is a novel prognostic indicator in ALL and AML: implications for risk stratification and future studies. *Cancer* 112, (2008), S. 407–415.
27. De Plaen, E., Arden, K., Travesi, C., Gaforio, J.J., Szikora, J.P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C. et al.: Structure, chromosomal localization and expression of twelve genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40, (1994), S. 360-369.
28. Dermime, S., Mavroudis, D., Jiang, YZ., Hensel, N., Molldrem, J., Barrett, A.J.: Immune escape from a graft-versus-leukemia effect may play a role in the relapse of myeloid leukemias following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 19, (1997), S. 989-999.
29. Deschler, B., Lübbert, M.: Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer.* 107, (2006), S. 2099-2107.

30. Dhodapkar, M.V., Krasovsky, J., Osman, K., Geller, M.D.: Vigorous premalignancy-specific effector T-cell response in the bone marrow of patients with monoclonal gammopathy. *J. Exp. Med.* 198, (2003), S. 1753-1757.
31. Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D.: The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, (2004), S. 137-148.
32. Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D.: The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22, (2004), S. 329-360.
33. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., Schreiber, R.D.: Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, (2002), S. 991-998.
34. Eisenbach, L., Bar-Haim, E., El-Shami, K.: Antitumor vakzination using peptide based vakzines. *Immunol Lett.* 74, (2000), S. 27-34.
35. El-Shami, K., Smith, B.D.: Immunotherapy for myeloid leukemias: current status and future directions. *Leukemia* 22, (2008) S. 1658-1664.
36. Foss, F.M.: DAB(389)IL-2 (denileukin diftitox, ONTAK): a new fusion protein technology. *Clin Lymphoma* 1, (2000), S. 27-31.
37. Gale, R.P., Foon, K.A.: Therapy of acute myelogenous leukemia. *Semin Hematol* 24, (1987), S. 40-54.
38. Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Pérez-Villar, J.J., López-Botet, M., Duggan-Keen, M., Stern, P.L.: Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 18, (1997), S. 89-95.
39. Guinn, B.A., Gilkes, A.F., Woodward, E., Westwood, N.B., Mufti, G.J., Linch, D., Burnett, A.K., Mills, K.I.: Microarray analysis of tumour antigen expression in presentation acute myeloid leukaemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 333,

(2005), S. 703-713.

40. Greiner, J., Ringhoffer, M., Taniguchi, M., Hauser, T., Schmitt, A., Döhner, H., Schmitt, M.: Characterization of several leukemia-associated antigens inducing humoral immune responses in acute and chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 106, (2003), S. 224-231.
41. Gong, J., Nikrui, N., Chen, D., Koido, S., Wu, Z., Tanaka, Y., Cannistra, S., Avigan, D., Kufe, D.: Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity. *J Immunol*. 165, (2000), S. 1705-1711.
42. Gorelik, L., Flavell, R.A.: Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol*. 2, (2002), S. 46-53.
43. Haas, G.G. Jr., D'Cruz, O.J., De Bault, L.E.: Distribution of human leukocyte antigen-ABC and -D/DR antigens in the unfixed human testis. *Am J Reprod Immunol Microbiol*. 18, (1988) S. 47-51.
44. Haferlach, T., Schoch, C., Hiddemann, W.: Die neue WHO-Klassifikation zur Einteilung der akuten myeloischen Leukämien (AML): Vorteile und Probleme im Vergleich zur FAB (French-American-British)-Klassifikation. *Laboratoriums Medizin*. 26, (2002), S.19-22.
45. Hannahan, D., Weinberg, R.A.: The hallmarks of cancer. *Cell* 100, (2000), S. 57-70.
46. Hardwick, N., Chan, L., Ingram, W., Mufti, G., Farzaneh, F.: Lytic activity against primary AML cells is stimulated in vitro by an autologous whole cell vaccine expressing IL-2 and CD80. *Cancer Immunol Immunother*. 59, (2010), S. 379-388.
47. Hiddemann, W., Spiekermann, K., Buske, C., Feuring-Buske, M., Braess, J.,

- Haferlach, T., Schoch, C., Kern, W., Schnittger, S., Berdel, W., Wörmann, B., Heinecke, A., Sauerland, C., Büchener, T.H.: Towards a pathogenesis-oriented therapy of acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 56, (2005), S. 235-245.
48. Hollenbeak, C.S., Todd, M.M., Billingsley, E.M., Harper, G., Dyer, A.M., Lengerich, E.J.: Increased incidence of melanoma in renal transplantation recipients. *Cancer* 104, (2005), S. 1962-1967.
49. Iversen, P.O., Semaeva, E., Sorensen, D.R., Wiig, H., Sioud, M.: Dendritic Cells Loaded with Tumor Antigens and a Dual Immunostimulatory and Anti-Interleukin 10-Specific Small Interference RNA prime T-Lymphocytes against Leukemic Cells. *Transl Oncol.* 2, (2009), 242-246.
50. Jaffee, E.M., Pardoll, D.M.: Considerations for the clinical development of cytokine gene-transduced tumor cell vaccines. *Methods* 2, (1997), S. 143-153.
51. Jäger, E., Ringhoffer, M., Karbach, J., Arand, M., Oesch, F., Knuth, A.: Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8(+) cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int J Cancer* 66, (1996), S. 470-476.
52. Jin, L., Lee, E.M., Ramshaw, H.S., Busfield, S.J., Peoppl, A.G., Wilkinson, L., Guthridge, M.A., Thomas, D., Barry, E.F., Boyd, A., Gearing, D.P., Vairo, G., Lopez, A.F., Dick, J.E., Lock, R.B.: Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. *Cell Stem Cell.* 5, (2009), S. 31-42.
53. Kahn, S., Begg, C., Mazza, J., Benett, J., Bonner, H., Glick, J. Full dose versus attenuated dose daunorubicin, cytosine arabinoside and 6-thioguanine in the treatment of acute leucemia in elderly. *J Clin Oncol* 2, (1984), S. 865-870.
54. Kao, J.H., Chen, D.S.: Recent updates in hepatitis vaccination and the

- prevention of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 97, (2002), S. 269-271.
55. Khanna, R., Burrows, S.R., Nicholls, J., Poulsen, L.M.: Identification of cytotoxic T cell epitopes within Epstein-Barr virus (EBV) oncogene latent membrane protein 1 (LMP1): evidence for HLA A2 supertype-restricted immune recognition of EBV-infected cells by LMP1-specific cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 28, (1998), S. 451-458.
 56. Kikuchi, T., Akasaki, Y., Irie, M., Homma, S., Abe, T., Ohno, T.: Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells. *Cancer Immunol Immunother.* 50, (2001), S. 337-344.
 57. Knutson, K.L., Dang, Y., Lu, H., Lukas, J., Almand, B., Gad, E., Azeke, E., Disis, M.L.: IL-2 immunotoxin therapy modulates tumor-associated regulatory T cells and leads to lasting immune-mediated rejection of breast cancers in neu-transgenic mice. *J Immunol.* 177, (2006), S. 84-91.
 58. Koido, S., Tanaka, Y., Chen, D., Kufe, D., Gong, J.: The kinetics of in vivo priming of CD4 and CD8 T cells by dendritic/tumor fusion cells in MUC1-transgenic mice. *J Immunol.* 168, (2002), S. 2111-2117.
 59. Koifmann, S., Pombo-de-Oliveira, M.S. and The Brazilian Collaborative Study Group of Infant Acute Leukemia.: High birth weight as an important risk factor for infant leukaemia. *Br J Cancer* 98, (2008), S. 664-667.
 60. Krammer, P.H.: CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, (2000), S. 789-795.
 61. Lange, B.J., Smith, F.O., Feusner, J. et al.: Outcomes in CCG-2961, a Children's Oncology Group phase 3 trial for untreated paediatric acute myeloid leukemia: A report from the Children's Oncology Group. *Blood* 111, (2008), S. 1044-1053.
 62. Larson, R.A., Boogaerts, M., Estey, E., Karanes, C., Stadtmauer, E.A., Sievers,

- E.L., Mineur, P., Bennett, J.M., Berger, M.S., Eten, C.B., Munteanu, M., Loken, M.R., Van Dongen, J.J., Bernstein, I.D., Appelbaum, F.R.: Antibody-targeted chemotherapy of older patients with acute myeloid leukemia in first relapse using Mylotarg (gemtuzumab ozogamicin). *Leukemia*. 16, (2002), S.1627-1636.
63. Leith, C., Kopecky, K., Godwin, J.: Acute myeloid leucemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. *Blood* 89, (1997), S. 3323-3329.
64. Li, W., Mi, Y.C., Wang, Y., Lin, D., Wie, H., Liu, X.P., Bian, S.G., Wang, J.X. Clinical features and prognosis of acute myeloid leukemia-M(4). *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 31, (2010), S.6-10.
65. Linsley, P.S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N.K., Ledbetter J.A.: Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med*. 173, (1991), S. 721-730.
66. Lowenberg, B., Downing, J.R., Burnett, A.: Acute myeloid leukaemia. *N Engl J Med* 341, (1999), S. 1051-1062.
67. Makita, M., Azuma, T., Hamaguchi, H., Niiya, H., Kojima, K., Fujita, S., Tanimoto, M., Harada, M., Yasukawa, M.: Leukemia-associated fusion proteins, dek-can and bcr-abl, represent immunogenic HLA-DR-restricted epitopes recognized by fusion peptide-specific CD4+ T lymphocytes. *Leukemia*. 16, (2002), 2400-2407.
68. Mao, C., Koutsky, L.A., Ault, K.A., Wheeler, C.M., Brown, D.R., Wiley, D.J., Alvarez, F.B., Bautista, O.M., Jansen, K.U., Barr, E.: Efficacy of human papillomavirus-16 vaccine to prevent cervical intraepithelial neoplasia: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*. 107, (2006), S. 18-27.

69. Marijt WA, Heemskerk MH, Kloosterboer FM, Goulmy E, Kester MG, van der Hoorn MA, van Luxemburg-Heys SA, Hoogeboom M, Mutis T, Drijfhout JW, van Rood JJ, Willemze R, Falkenburg JH. Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Mar 4;100(5):2742-7.

70. Mayordomo, J.I., Zorina, T., Storkus, W.J., Zitvogel, L., Garcia-Prats, M.D., DeLeo, A.B., Lotze, M.T.: Bone marrow-derived dendritic cells serve as potent adjuvants for peptide-based antitumor vaccines. *Stem Cells* 15, (1997), S. 94-103.

71. Millard, A.L., Ittelet, D., Schooneman, F., Bernard, J.: Dendritic cell KLH loading requirements for efficient CD4(+) T-cell priming and help to peptide-specific cytotoxic T-cell response, in view of potential use in cancer vaccines. *Vaccine* 21, (2003), S. 869-876.

72. Mills, K.: Gene expression profiling for the diagnosis and prognosis of acute myeloid leukaemia. *Front Biosci* 13, (2008), S. 4605-4616.

73. Moingeon, P.: Cancer vaccines. *Vaccine* 19, (2001), S. 1305-1326.

74. Mrózek, K., Bloomfield, C.D.: Clinical significance of the most common chromosome translocations in adult acute myeloid leukemia. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 39, (2008), S. 52-57.

75. Munn, D.H., Mellor, A.L.: Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest*. 117, (2007), S. 1147-1154.

76. Nestle, F.O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., Schadendorf, D.: Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med*. 4 (1998), S. 328-332.

77. Nishikawa, H., Jäger, E., Ritter, G., Old, L.J., Gnjatic, S.: CD4(+) CD25+ regulatory T cells control the induction of antigen-specific CD4(+) helper T cell responses in cancer patients. *Blood* 106, (2005), S. 1008-1011.
78. Offringa, R., van der Burg, S.H., Ossendorp, F., Toes, R.E., Melief, C.J.: Design and evaluation of antigen-specific vaccination strategies against cancer. *Curr Opin Immunol.* 12, (2000), S. 576-582.
79. Panoskaltsis, N., Reid, C.D., Knight, S.C.: Quantification and cytokine production of circulating lymphoid and myeloid cells in acute myelogenous leukaemia. *Leukemia* 17, (2003), S. 716-730.
80. Pattengale, P.K., Sundstrom, C., Yu, A.L., Levine, A.: Lysis of fresh leukemic blasts by interferon-activated human natural killer cells. *Nat Immun Cell Growth Regul.* 3, (1983), S. 165-180.
81. Penn, I.: Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug Saf.* 23, (2000) S. 101-113.
82. Pichlmair, A., Diebold, S.S., Gschmeissner, S. et al.: Tubulovesicular structures within vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped lentiviral vector preparations carry DNA and stimulate antiviral responses via Toll-like receptor 9. *J. Virol* 81, (2007), S. 539-547.
83. Porter, D.L., Roth, M.S., Lee, S.J., et al.: Adoptive immunotherapy with donor mononuclear cell infusion to treat relapse of acute leukemia or myelodysplasia after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 18, (1996), S. 975-980.
84. Powles, R.L., Lister, T.A., Crowther, D. et al.: Immunotherapy for acute myelogenous leukemia. *Bibl Haematol* 40, (1975), S. 737-749.
85. Powles, R.L., Russell, J., Lister, T.A. et al.: Immunotherapy for acute

- myelogenous leukaemia: A controlled clinical study 2 1/2 years after entry of the last patient. *Br J Cancer* 35, (1977), S. 265–272.
86. Prehn, R.T., Main, J.M.: Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst.* 18, (1957), S. 769-778.
 87. Qazilbash, MH., Wieder, ED., Thall, PF et al.: PR1 vaccine elicited immunological response after hematopoietic stem cell transplantation is associated with better clinical response and event-free survival. *Blood* 110, (2007), S. 577.
 88. Quezada, S.A., Simpson, T.R., Merghoub, T., Vider, J., Fan, X., Blasberg, R., Yagita, H., Muranski, P., Antony, P.A., Restifo, N.P., Allison, J.P.: Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J Exp Med.* 207, (2010), S. 637-650.
 89. Rescigno, M., Avogadri, F., Curigliano, G.: Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment. *Biochim Biophys Acta* 1776, (2007), S. 108-123.
 90. Rezvani, K., Yong, A.S., Mielke, S., Savani, B.N., Musse, L., Superata, J., Jafarpour, B., Boss, C., Barrett, A.J.: Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies. *Blood* 111, (2008), S. 236-242.
 91. Robbins, P.F., El-Gamil, M., Li, Y.F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., Rosenberg, S.A.: A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med.* 183, (1996), S. 1185-1192.
 92. Romero, A.I., Thorén, F.B., Aurelius, J., Askarieh, G., Brune, M., Hellstrand, K.: Post-consolidation immunotherapy with histamine dihydrochloride and

interleukin-2 in AML. *Scand J Immunol* 70, (2009), S. 194–205.

93. Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Leitman, S., Chang, A.E., Ettinghausen, S.E., Matory, Y.L., Skibber, J.M., Shiloni, E., Vetto, J.T. et al.: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med.* 313, (1985), S. 1485-1492.
94. Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Restifo, N.P.: Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med.* 10, (2004), S. 909-915.
95. Rosenberg, S.A., Yang, J.C., White, D.E., Steinberg, S.M.: Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg.* 228, (1998), S. 307-319.
96. Rosenberg, S.A.: Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411, (2001), S. 380-384.
97. Rosenberg, S.A., Restifo, N.P., Yang, J.C., Morgan, R.A., Dudley, M.E.: Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 8, (2008), S. 299-308.
98. Rowe, J.M., Neuberg, D., Friedenberg, W., Bennett, J.M., Paietta, E., Makary, A.Z., Liesveld, J.L., Abboud, C.N., Dewald, G., Hayes, F.A., Tallman, M.S., Wiernik, P.H.: A phase 3 study of three induction regimens and of priming with GM-CSF in older adults with acute myeloid leukemia: a trial by the Eastern Cooperative Oncology Group. *Blood* 103, (2004), S. 479-85.
99. Savai, R., Schermuly, R.T., Pullamsetti, S.S., Schneider, M., Greschus, S., Ghofrani, H.A., Traupe, H., Grimminger, F., Banat, G.A.: A combination hybrid-based vaccination/adoptive cellular therapy to prevent tumor growth by involvement of T cells. *Cancer Res.* 67, (2007), S. 5443-5453.

100. Schmid, C., Labopin, M., Nagler, A., Bornhäuser, M., Finke, J., Fassas, A., Volin, L., Gürman, G., Maertens, J., Bordigoni, P., Holler, E., Ehninger, G., Polge, E., Gorin, N.C., Kolb, H.J., Rocha, V.: Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. *J Clin Oncol.* 25, (2007), S. 4938-4945.

101. Schmidt, S.M., König, T., Bringmann, A., Held, S., von Schwarzenberg, K., Heine, A., Holderried, T.A., Stevanovic, S., Grünebach, F., Brossart, P.: Characterization of BAX inhibitor-1 as a novel leukemia-associated antigen. *Leukemia* 23, (2009), S. 1818-1824.

102. Scott, A.M., Welt, S.: Antibody-based immunological therapies. *Curr Opin Immunol.* 9, (1997), S. 717-722.

103. Senju, S., Hirata, S., Motomura, Y., Fukuma, D., Matsunaga, Y., Fukushima, S., Matsuyoshi, H., Nishimura, Y.: Pluripotent stem cells as source of dendritic cells for immune therapy. *Int J Hematol.* 91, (2010), S. 392-400.

104. Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., Schreiber, R.D.: IFN γ and lymphocytes prevent primary tumor development and shape tumor immunogenicity. *Nature* 410, (2001), S. 1107-1111.

105. Siegel, B.V.: Immunology and oncology. *Int Rev Cytol.* 96, (1985), S. 89-120.

106. Smith, M., Barnett, M., Bassan, R., Gatta, G., Tondini, C., Kern, W.: Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 50, (2004), S. 197-222.

107. Smits, E.L., Berneman, Z.N., Van Tendeloo, V.F.: Immunotherapy of acute myeloid leukemia: current approaches. *Oncologist.* 14, (2009), S. 240-252.

108. Soiffer, R., Lynch, T., Mihm, M., Jung, K., Rhuda, C., Schmollinger, J.C., Hodi, F.S., Liebster, L., Lam, P., Mentzer, S., Singer, S., Tanabe, K.K., Cosimi, A.B., Duda, R., Sober, A., Bhan, A., Daley, J., Neuberg, D., Parry, G., Rokovich, J., Richards, L., Drayer, J., Berns, A., Clift, S., Cohen, L.K., Mulligan, R.C., Dranoff, G.: Vakzination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95, (1998), S. 13141-13146.

109. Song, W., Kong, H.L., Carpenter, H., Torii, H., Granstein, R., Rafii, S., Moore, M.A., Crystal, R.G.: Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity. *J Exp Med*. 186, (1997), S. 1247-1256.

110. Specht, J.M., Wang, G., Do, M.T., Lam, J.S., Royal, R.E., Reeves, M.E., Rosenberg, S.A., Hwu, P.: Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases. *J Exp Med*. 186, (1997), S. 1213-1221.

111. Stassi, G., Todaro, M., Zerilli, M., Ricci-Vitiani, L., Di Liberto, D., Patti, M., Florena, A., Di Gaudio, F., Di Gesù, G., De Maria, R.: Thyroid cancer resistance to chemotherapeutic drugs via autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10. *Cancer Res*. 63, (2003), S. 6784-6790.

112. Stripecke, R., Koya, R.C., Ta, H.Q., et al. The use of lentiviral vectors in gene therapy of leukemia: Combinatorial gene delivery of immunomodulators into leukemia cells by state-of-the-art vectors. *Blood Cells Mol Dis* 2003; 31: 28-37.

113. Sumimoto, H., Tani, K., Nakazaki, Y., Tanabe, T., Hibino, H., Hamada, H., Azuma, M., Asano, S.: GM-CSF and B7-1 (CD80) co-stimulatory signals cooperate in the induction of effective anti-tumor immunity in syngeneic mice. *Int J Cancer* 14, (1997), S. 556-561.

114. Tabi, Z., Man, S.: Challenges for cancer vaccine development. *Adv Drug Deliv Rev.* 58, (2006), S. 902-915.
115. Takahashi, K., Shichijo, S., Noguchi, M., Hirohata, M., Itoh, K.: Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. *Cancer Res.* 55, (1995), S. 3478-3482.
116. Tallmann, S.M., Gilliland, D.G., Rowe, J.M.: Drug therapy for acute myeloid leukaemia. *Blood* 106, (2005), S. 1154-1163.
117. Tamm, I., Richter, S., Scholz, F., Schmelz, K., Oltersdorf, D., Karawajew, L., Schoch, C., Haferlach, T., Ludwig, W.D., Wuchter, C.: XIAP expression correlates with monocytic differentiation in adult de novo AML: impact on prognosis. *Hematol J.* 5, (2004), S. 489-495.
118. Terabe, M., Ambrosino, E., Takaku, S., O'Konek, J.J., Venzon, D., Lonning, S., McPherson, J.M., Berzofsky, J.A.: Synergistic enhancement of CD8(+) T cell-mediated tumor vaccine efficacy by an anti-transforming growth factor-beta monoclonal antibody. *Clin Cancer Res.* 15, (2009), S. 6560-6569.
119. Thompson, R.H., Dong, H., Lohse, C.M., Leibovich, B.C., Blute, M.L., Cheville, J.C., Kwon, E.D.: PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 13, (2007), S. 1757-1761.
120. Thurner, B., Haendle, I., Röder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den Driesch, P., Bröcker, E.B., Steinman, R.M., Enk, A., Kämpgen, E., Schuler, G.: Vakzination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med.* 190, (1999), S. 1669-1678.
121. Tiemessen, M.M., Mitchell, T.J., Hendry, L., Whittaker, S.J., Taams, L.S., John,

- S.: Lack of suppressive CD4(+)CD25+FOXP3+ T cells in advanced stages of primary cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol.* 126, (2006), S. 2217-2223.
122. Timmerman, J.M., Czerwinski, D.K., Davis, T.A., Hsu, F.J., Benike, C., Hao, Z.M., Taidi, B., Rajapaksa, R., Caspar, C.B., Okada, C.Y., van Beckhoven, A., Liles, T.M., Engleman, E.G., Levy, R.: Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 99, (2002), S. 1517-1526.
123. Topalian, S.L., Solomon, D., Avis, F.P., Chang, A.E., Freerksen, D.L., Linehan, W.M., Lotze, M.T., Robertson, C.N., Seipp, C.A., Simon, P. et al.: Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2: a pilot study. *J Clin Oncol.* 6, (1988), S. 839-853.
124. Townsend, S.E., Allison, J.P.: Tumor rejection after direct costimulation of CD8(+) T cells by B7-transfected melanoma cells. *Science* 259, (1993), S. 368-370.
125. Tsang, K.Y., Zaremba, S., Nieroda, C.A., Zhu, M.Z., Hamilton, J.M., Schlom, J.: Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vakzinia-CEA vakzine. *J Natl Cancer Inst.* 87, (1995), S. 982-990.
126. Tsang, K.Y., Zhu, M., Nieroda, C.A., Correale, P., Zaremba, S., Hamilton, J.M., Cole, D., Lam, C., Schlom, J.: Phenotypic stability of a cytotoxic T-cell line directed against an immunodominant epitope of human carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res.* 3, (1997), S. 2439-2449.
127. U.S. Government Statistics. Surveillance, epidemiology, and end-results (SEER) of the National Cancer Institute. (2002)

128. Vago, L., Perna, S.K., Zanussi, M. et al.: Loss of mismatched HLA in leukemia after stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 361, (2009), S. 478–488.
129. Van Luijn, M.M., Chamuleau, M.E., Thompson, J.A. et al.: CLIP down-modulation enhances the immunogenicity of myeloid leukemic blasts resulting in increased CD4⁺ T cell responses. *Haematologica* 95, (2010), S. 485–493.
130. Verheyden, S., Ferrone, S., Mulder, A. et al.: Role of the inhibitory KIR ligand HLA-Bw4 and HLA-C expression levels in the recognition of leukemic cells by natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother* 58, (2009), S. 855–865.
131. Wallich, R., Bulbuc, N., Hämmerling, G.J., Katzav, S., Segal, S., Feldman, M.: Abrogation of metastatic properties of tumour cells by de novo expression of H-2K antigens following H-2 gene transfection. *Nature* 315, (1985), S. 301-305.
132. Wang, L., Wen, W., Yuan, J., Helfand, B., Li, Y., Shi, C., Tian, F., Zheng, J., Wang, F., Chen, L., Liang, L., Zhou, L., Lee, C., Chen, Z., Guo, Y., Wang, H., Zhang, Q., Qin, W.: Immunotherapy for human renal cell carcinoma by adoptive transfer of autologous transforming growth factor beta-insensitive CD8(+) T cells. *Clin Cancer Res.* 16, (2010), S. 164-173.
133. Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D., Dalton, W., Jove, R., Pardoll, D., Yu, H.: Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med.* 10, (2004), S. 48-54.
134. Whiteway, A., Corbett, T., Anderson, R., Macdonald, I., Prentice, H.G.: Expression of co-stimulatory molecules on acute myeloid leukaemia blasts may effect duration of first remission. *Br J Haematol* 120, (2003), S. 442–451.
135. Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wölfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Büschenfelde, K.H., Beach, D.A.: p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a

- human melanoma. *Science* 296, (1995), S. 1281-1284.
136. Yan, W.H., Lin, A., Chen, B.G. et al.: Unfavourable clinical implications for HLA-G expression in acute myeloid leukaemia. *J Cell Mol Med* 12, (2008), S. 889–898.
137. Ying, H., Zaks, T.Z., Wang, R.F., Irvine, K.R., Kammula, U.S., Marincola, F.M., Leitner, W.W., Restifo, N.P.: Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine. *Nat Med*. 5, (1999), S. 823-827.
138. Zhang, W.G., Liu, S.H., Cao, X.M., Cheng, Y.X., Ma, X.R., Yang, Y., Wang, Y.L.: A phase-I clinical trial of active immunotherapy for acute leukemia using inactivated autologous leukemia cells mixed with IL-2, GM-CSF, and IL-6. *Leuk Res*. 29, (2005), S. 3-9.
139. Zitvogel, L., Tesniere, A., Kroemer, G.: Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 6, (2006), S. 715-727.
140. Zitvogel, L., Casares, N., Pequignot, M., Albert, M.L., Kroemer, G.: The immune response against dying tumor cells. *Adv. Immunol*. 84, (2004), S. 131-179.

13 Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

14 Ethik-Kommission

JUSTUS-LIEBIG-



Ethik-Kommission, Gaffkystr. 11c, D-35385 Gießen

Herrn
Dr. G.-A. Banat
Med. Klinik, Abt. Hämatologie/Onkologie
Klinikstr. 36

Hauspost

Klinikum
ETHIK-KOMMISSION
am FB Humanmedizin

Vorsitzender:
Prof. Dr. E. Habermann
Gaffkystr. 11c
D-35385 Gießen
Tel.: (0641) 99-47660/42470

Gießen, den 14.12.2000
Az.: Prof. Ha/Erb

Unser Zeichen: 103/00
Sitzung am: 07.12.2000

Titel: *Charakterisierung autologer leukämiespezifischer T-Lymphozyten und Detektion leukämiespezifischer Peptide bei der AML inv(16).*

Es handelt sich um eine Erstbegutachtung für den Leiter der Klinischen Prüfung (LKP) ☒
Es handelt sich um eine Anschlussbegutachtung ☐

Eingesandte Unterlagen:

- ☐ Vorbegutachtung(en) durch andere Ethik-Kommissionen
- ☐ Formalisierter Antrag
- ☒ Ausführliche Darstellung des Vorhabens
- ☒ Information und Einwilligungserklärung der Patienten/Probanden
- ☐ Nachweis der Versicherung

Der Antrag wurde unter ethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und rechtlichen Gesichtspunkten geprüft. Soweit betreffend, wurde **das auf Seite 2 wiedergegebene Protokoll** unter Berücksichtigung des Good Clinical Practice for Trials on Medicinal Products in the European Community erstellt. Es bezieht sich auf die vorgelegte Fassung des Antrags.

Forderungen der Ethik-Kommission, soweit darin aufgeführt, wurden inzwischen erfüllt. ☐
Sie stimmt dem Vorhaben zu. ☒
Sie stimmt dem Vorhaben unter Auflagen zu (siehe S. 2). ☐
Sie stimmt dem Vorhaben nicht zu (siehe S. 2). ☐

Die Ethik-Kommission erwartet, daß ihr bis 14.12.02 ohne Aufforderung ein kurzer Bericht auf beigefügtem Formblatt übermittelt wird. Er soll mitteilen, ob das Ziel der Studie erreicht wurde, ob ethische, medizinisch-wissenschaftliche oder rechtliche Probleme aufgetreten sind, und ob das Ergebnis publiziert ist/wird. Unabhängig davon ist die Ethik-Kommission über alle Änderungen des Prüfplans zu unterrichten. Ihr sind alle schweren unerwünschten Wirkungen mitzuteilen, soweit sie im Bereich der Zuständigkeit dieser Ethik-Kommission aufgetreten sind. Bei überregionalen Studien sind sie auch dem LKP mitzuteilen.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Prüfung und der an der Prüfung teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethik-Kommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Die Namen der bei dieser Sitzung anwesenden Mitglieder sind hervorgehoben.

Mitglieder: Frau Dr. Blütters-Sawatzki (Pädiatrie); Dr. Büdeker (Informatik); Prof. Brethaupt (Klinische Pharmakologie); Herr Brumhard (Pharmazie); Prof. Federlin (Innere Medizin); Prof. Habermann (Vorsitz, Pharmakologie); Prof. Schapp (Bürgerliches Recht); Prof. Schwemmler (Chirurgie); Prof. Wielter (Rechtsmedizin).
Vertreter: Prof. Dudeck (Informatik); P. Gödicke (Bürgerliches Recht); PD Dr. Hirsch (Dermatologie); Frau PD Dr. Kemkes-Matthes (Innere Medizin); Frau Kreckel (Pharmazie); Prof. Künzel (Gynäkologie); Prof. Lasch (Innere Medizin); Prof. Schachenmayr (Neuropathologie).

15 Danksagung

An dieser Stelle gilt mein besonderer Dank allen, die durch fachliche Unterstützung oder viel Geduld einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Herrn Prof. Dr. med. G.-A. Banat danke ich für das zur Verfügung gestellte herausfordernde Thema, die umfangreichen Laboreinrichtungen und Materialien, die diese Arbeit ermöglicht haben sowie für die konstante und engagierte Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Marianne Hoeck und Herrn Dr. Raj Savai für die Einführung in die Laborarbeit, ihre kompetente und unermüdliche Hilfe und die gute Stimmung im Labor.

Ebenfalls danke ich den Patienten der Hämatologie/Onkologie sowie den Freunden und Kollegen, ohne deren großzügige Blutspende diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Allen Mitarbeitern des Hämatologie-Labors danke ich für das gute Arbeitsklima sowie den hilfreichen und regen Austausch.

Ich danke meiner Mutter und meiner Schwester, dass eine unglaubliche Anzahl an orthografischen Fehlern entdeckt und beseitigt wurde.

Als letztes gilt mein Dank meiner Familie, Thorsten und Hamida. Ohne eure Unterstützung wäre ich in zehn Jahren noch nicht fertig!